

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra Fyziologie živočichů a vývojové biologie**

Diplomová práce:

**Imunitní mechanismy v patogenezi parodontitidy**

**Kazi Svobodová**

**Praha, 2007**

**Vedoucí práce:** RNDr. Jiřina Bártová, CSc.

Výzkumný ústav stomatologický VFN, a 1. LF UK

Vinohradská 48, Praha 2

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně jen s použitím citované literatury.

V Praze 1. září 2007

*Svobodová*

.....  
Kazi Svobodová

Předkládaná diplomová práce byla vypracována na imunologickém oddělení Výzkumného ústavu stomatologického v Praze. Ráda bych tímto poděkovala vedení Výzkumného ústavu stomatologického, VFN Praha prof. MUDr. Janě Duškové DrSc., MBA za možnost vypracování diplomové práce na tomto pracovišti, zvláště pak mé školitelce RNDr. Jiřině Bártové CSc., za odborné vedení a všestrannou podporu, prof. MUDr. Lydii Izakovičové – Hollé, PhD. za odborné konzultace, Mgr. Elišce Krásné a celé HLA laboratoři IKEM za možnost práce s přístrojem LUMINEXEM, Dr. Luborovi Mrklasovi za pomoc se statistickým zpracováním výsledků a všem kolegům za trpělivost.

Ráda bych poděkovala i svým rodičům za možnost studia a duševní podporu.

V mé diplomové práci navazuji na poznatky Výzkumného ústavu stomatologického z období 1992 - 2006, vycházím zejména ze závěrů prací Kláry Benetkové (1995), Martiny Otčenáškové (2005), Zuzany Opatrné – Krátké (1998, 2006). Práce byla vypracována v rámci grantového projektu IGA MZ ČR číslo NR 9129-3.

## Souhrn

### Imunitní mechanismy v patogenezi parodontitidy

Parodontitida je multifaktoriální chronické zánětlivé onemocnění závěsného aparátu zubů. Rizikové faktory vzniku onemocnění parodontu jsou genetická predispozice, bakterie zubního povlaku a imunitní reakce. Vývoj a regulace imunitní odpovědi závisí na lokální tvorbě a množství celé řady faktorů, z nichž významnou úlohu hrají prozánětlivé cytokiny.

Cíle diplomové práce byli, na základě jednonukleotidových polymorfismů v genech pro cytokiny sledovat jejich vztah k regulaci imunitní odpovědi a klinickému stavu parodontu a tak upřesnit rizikové faktory parodontitidy a zavedení multiplexové analýzy cytokinů metodou LUMINEX a její následná aplikace. Metoda nám umožňuje rychlé stanovení koncentrace velkého počtu cytokinů v malém množství vzorku.

V naší práci jsme se zaměřili na sledování tvorby cytokinů (IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) po stimulaci mononukleárních buněk mitogeny (Pokeweed mitogen, ConcavalinA), bakteriemi zubního povlaku *Actinobacillus*

*actinomycetemcomitans (A.a.)*, *E.coli*, *Tannerella forsythensis (T.f.)*, *Porphyromonas gingivalis (P.g.)* a Heat Shock Proteinem 60 (HSP) u pacientů s chronickou

parodontitidou ve vztahu k prokázanému polymorfismu genů pro cytokiny. Studií jsme potvrdili, že jednonukleotidové polymorfismy v genech pro cytokiny ovlivňují jejich zvýšenou i sníženou tvorbu. Zjistili jsme, že mononukleární buňky izolované z periferní krve pacientů s prokázaným polymorfismem genu pro IL-1  $\beta$  tvoří signifikantně méně cytokinů IL-1  $\beta$ , ale i IL-4, IFN-  $\gamma$ , IL-6, IL-10 (po stimulaci bakteriemi *A.a.*, *E.coli*, *T.f.*, HSP) a naopak signifikantně více IL-5 (po stimulaci *A.a.*) a IL-8 (po stimulaci *P.g.*). Prokázané polymorfismy pro IL-4 (IL-4 C/T v pozici - 589, IL - 4 C/T v pozici -33, IL -4 intron3 v pozici -254 nebo -184) naznačují vyšší tvorbu IL-4 po stimulaci všemi stimulanty, zatímco signifikantně vyšší tvorbu IFN-  $\gamma$  pouze po stimulaci *E.coli*. I v této předběžné studii jsme potvrdili význam TH2 subpopulace lymfocytů v onemocnění parodontitidy.

Klíčová slova: chronická parodontitida, bakterie zubního povlaku, polymorfismus, genotyp, cytokinová síť, multiplexová analýza

**Abstract:**

**Immune mechanisms in the pathogenesis of periodontitis**

Periodontitis is a multifactorial chronic inflammatory disease of teeth supporting apparatus. Risk factors are genetic predispositions, dental plaque bacteria and immune reactions. Development and regulation of immune responses depend on local production of cytokines and many other factors.

The aim of diploma thesis was to assess the risk factors of parodontitis by studying single nucleotide polymorphism (SNP) in genes for cytokines, SNP relationship to immunity regulation in comparison with clinical status of periodontium.

The aim of the first part of the study, was introduction of multiplex cytokines analysis by LUMINEX method and application of this method in clinical practice. The method provides quick determination of many cytokines' concentrations in sample with a small volume.

In our study we focused on cytokine production monitoring (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN -  $\gamma$ ) after stimulation of mononuclear cells by mitogens, dental plaque bacteria (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Escherichia coli*, *Tannerella forsythensis* and Heat Shock Protein 60 (HSP) in relation to SNP in patients with chronic periodontitis.

In our study we confirmed that the SNP in cytokine genes influence the function of mononuclear cells. We found that mononuclear cells isolated from peripheral blood of patients with proved SNP IL-1 $\beta$  in position 3953 produced significantly decreased amount of IL-1 $\beta$ , IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-10 (after stimulation by *A.a.*, *E. coli*, *T.f.* and HSP) and significantly increased amount of IL-5 (after stimulation by *A.a.*) and IL-8 (after stimulation by *P.g.*). All proved SNP IL-4 (IL-4 C/T in position - 589, C/T in position -33, IL - 4 intron3 in position -254 or -184) indicate higher production of IL-4 after the stimulation by all bacteria and HSP while significantly higher production of IFN-  $\gamma$  was confirmed after the stimulation with *E.coli*.

In this preliminary study we confirmed the significant role of T<sub>H</sub>2 lymphocyte subpopulation in periodontal disease.

**Key words:** chronic periodontitis, dental plaque bacteria, genotype, single nucleotide polymorphism (SNP), cytokines, multiplex analysis

# 1.OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.OBSAH</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>2. SEZNAM ZKRATEK</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>3. ÚVOD</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>4. PŘEHLED SOUČASNÝCH POZNATKŮ</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>4.1. STAVBA PARODONTU (OBR.1)</b> .....  | <b>11</b> |
| <b>4.2. ONEMOCNĚNÍ PARODONTU</b> .....  | <b>15</b> |
| 4.2.1. <i>PŘÍČINY VZNIKU A ROZVOJE PARODONTITIDY</i> .....  | 15        |
| 4.2.2. <i>MECHANISMUS RESORPCE ALVEOLÁRNÍ KOSTI</i> .....   | 16        |
| <b>4.3. TYPY PARODONTITID</b> .....   | <b>19</b> |
| 4.3.1. <i>CHRONICKÁ GINGIVITIDA</i> .....   | 20        |
| 4.3.2. <i>PARODONTITIDA DOSPĚLÝCH (AP-ADULT PERIODONTITIS)</i> .....  | 20        |
| 4.3.3. <i>ČASNÁ PARODONTITIDA – (EOP – EARLY ONSET PARIODONTITIS)</i> .....   | 20        |
| 4.3.3.1. <i>Prepubertální parodontitida (PP-prepubertal periodontitis)</i> .....  | 21        |
| 4.3.3.2. <i>Juvenilní parodontitida (JP-juvenile periodontitis)</i> .....   | 21        |
| 4.3.3.4. <i>Parodontitida mladšího dospělého věku s rychlou progresí onemocnění (RPP – rapidly progressive periodontitis)</i> ..... | 22        |
| <b>4.4. RIZIKOVÉ FAKTORY VZNIKU PARODONTITIDY</b> .....   | <b>23</b> |
| 4.4.1. <i>GENETICKÁ PREDISPOZICE</i> .....  | 23        |
| 4.4.2. <i>ZUBNÍ POVLAH A BAKTERIE</i> .....   | 24        |
| 4.4.3. <i>PORUCHA FUNKCE POLYMORFONUKLEÁRŮ (PMN)</i> .....  | 27        |
| 4.4.4. <i>KORELACE S DALŠÍMI CHOROBAMI</i> .....  | 28        |
| 4.4.4.1. <i>Parodontitida jako rizikový faktor aterosklerózy</i> .....  | 29        |
| 4.4.4.2. <i>Úloha HSP v rozvoji parodontitidy</i> .....   | 31        |
| 4.4.4.3. <i>Parodontitida ve vztahu k pacientům HIV pozitivních</i> .....   | 32        |
| 4.4.5. <i>DALŠÍ RIZIKOVÉ FAKTORY</i> .....  | 32        |
| <b>4.5. IMUNTINÍ MECHANISMY PARODONTITIDY</b> .....   | <b>34</b> |
| 4.5.1. <i>MECHANISMY NESPECIFICKÉ IMUNITY</i> .....   | 34        |
| 4.5.2. <i>MECHANISMY SPECIFICKÉ IMUNITY</i> .....   | 36        |
| 4.5.3. <i>CYTOKINY A STAV PARODONTU</i> .....   | 39        |
| 4.5.3.1. <i>Polymorfismus genů pro</i> .....  | 40        |
| 4.5.3.1 <i>Polymorfismus genů pro cytokiny</i> .....  | 41        |
| <b>5. MATERIÁL A METODIKA</b> .....   | <b>43</b> |
| <b>5.1. CHARAKTERISTIKA PACIENTŮ</b> .....  | <b>43</b> |
| <b>5.2. POUŽITÉ ROZTOKY A CHEMIKÁLIE</b> .....  | <b>45</b> |
| 5.2.1. <i>ROZTOKY POUŽÍVANÉ VE VĚTŠINĚ TESTŮ</i> .....  | 45        |
| 5.2.2. <i>STIMULACE BUNĚK - AKTIVÁTORY LYMFOCYTŮ K PRODUKCI CYTOKINŮ</i> .....  | 45        |
| 5.2.3. <i>CHEMIKÁLIE A REAGENCIE POUŽITÉ V METODĚ LUMINEX</i> .....   | 46        |
| 5.2.4. <i>CHEMIKÁLIE A ROZTOKY POUŽÍVANÉ PŘI IZOLACI DNÁ A NÁSLEDNĚ AMPLIFIKACI</i> .....   | 48        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5.3. METODY</b> .....  | <b>49</b> |
| 1. SEPARACE MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK Z PERIFERNÍ KRVE POMOCÍ FICOLL – PAQUE GRADIENTU.....   | 49        |
| 2. STIMULACE LYMFOCYTŮ K TVORBĚ CYTOKINŮ.....   | 51        |
| METODA LUMINEX .....  | 53        |
| 4. GENETICKÁ VYŠETŘENÍ POLYMORFISMU GENŮ PRO CYTOKINY .....   | 57        |
| <b>6. VÝSLEDKY</b> .....  | <b>59</b> |
| <b>6.1. ZAVEDENÍ METODY LUMINEX</b> .....   | <b>59</b> |
| <b>6.2. PRODUKCE CYTOKINŮ MONONUKLEÁRNÍMI BUŇKAMI PO STIMULACI<br/>MITOGENY A BAKTERIEMI MĚŘENÁ METODOU MULTIPLEXOVÉ ANALÝZY –<br/>METODOU LUMINEX.</b> ..... | <b>59</b> |
| 6.2.1. VÝSLEDKY ANALYTICKÉHO ZPRACOVÁNÍ DAT MĚŘENÍ.....   | 60        |
| 6.2.2 VÝSLEDKY TVORBY CYTOKINŮ PO MITOGENNÍ A BAKTERIÁLNÍ STIMULACI 3. A 6. DEN.....  | 65        |
| <b>6.2. VÝSLEDKY GENETICKÝCH VYŠETŘENÍ POLYMORFISMŮ GENŮ PRO<br/>CYTOKINY</b> .....   | <b>79</b> |
| <b>6.3. VÝSLEDKY VZÁJEMNÉ KORELACE PRODUKCE CYTOKINŮ K POLYMORFISMU<br/>GENŮ PRO CYTOKINY</b> .....   | <b>80</b> |
| <b>7. DISKUSE</b> .....   | <b>89</b> |
| <b>8. ZÁVĚR</b> .....   | <b>94</b> |
| <b>9. SEZNAM LITERATURY</b> .....   | <b>95</b> |

## 2. SEZNAM ZKRATEK

*A.a.* – *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

AIDS - Acquired ImmunoDeficiency Symdrom

AP - adult periodontitis, parodontitda dospělých

APC – Antigen Presenting Cell

AT – aterosklerósa

CAL – ztráta úponu (clinical attachment loss)

CP – chronická parodontitida

CPITN - Community Periodontal Index of Treatment Needs

ConA – Concanavalin A

CRP – C - reaktivní protein

GI - gingivální index

GJP - generalizovaná juvenilní parodontitida

HIV - Human immunodeficiency virus

HDL – hight – density lipoprotein

EOP – Early Onset Periodontitis

h.m. – molekulová hmotnost

HSP - heat shock proteins

IgA - imunoglobulin A

IgE - imunoglobulin E

IgG - imunoglobulin G

IKEM – Institut Klinické a Experimentální Medicíny

IL-1 - interleukin 1

INF $\gamma$  - interferon – gama

ICHS – ischemická choroba srdce

JP - juvenilní parodontitida

Kgp - lysin-gingipain proteáza

LAD - leukocyte adherence deficiency

LBP - lipid binding protein

LDL – Low-Density Lipoprotein (lipoprotein nízké density)

LJP - lokalizovaná juvenilní parodontitida

LPS – lipopolysacharid



MCP - macrophage chemoattractant protein  
MIP - macrophage inflammatory protein  
NK - natural killer  
OPG – osteoprotegerin  
OPGL – Osteoprotegerin Ligand  
Ox – LDL – oxidized Low-Density Lipoprotein (oxidovaný lipoprotein nízké density)  
PAMP - Pathogen Associated Molecular Pattern  
PBS – fosfát fyziologický roztok  
PMN - polymorfonukleární buňka = neutrofilní granulocyt  
PRR - Pattern Recognition Receptors  
*P.intermedia* – *Prevotella intermedia*  
*P.gingivalis* – *Porphyromonas gingivalis*  
PP - prepubertální parodontitida  
PWM – Pokeweed mitogen  
RANK – Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B  
RANKL – Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B ligand  
RANTES – Regulated Upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted  
Rgp - arginin – gingipain proteáza  
RPP - rychle progredující parodontitida  
SI – stimulační index  
SE – spojovací epitel  
*T. forsythensis* – *Tannerella forsythensis*  
Tc – cytotoxický T lymfocyt (CD8 pozitivní)  
TCR – T receptor  
TGF – Transforming –Growth Factor  
Th - pomocný T lymfocyt (CD4 pozitivní)  
TNF $\alpha$  - tumor nekrotizující faktor - alfa  
TLR – toll like receptors  
VFN – Všeobecná fakultní nemocnice  
VÚS – Výzkumný ústav stomatologický  
WHO - World Health Organization

# ÚVOD

### 3. ÚVOD

Parodontitida je chronické zánětlivé onemocnění závěsného aparátu zubů. Jde o multifaktoriální onemocnění, jehož vznik i průběh ovlivňuje prostředí dutiny ústní i faktory vnějšího prostředí. Mezi faktory vnitřního prostředí řadíme produkty bakterií, které pokrývají povrch zubů, kvalitu ústní hygieny, přítomnost zubního kazu, dietetické návyky, kouření a další. Patologické změny jsou charakterizovány zánětem dásní, tvorbou parodontálního chobotu, postupnou resorpcí alveolární kosti a výraznou změnou spektra subgingivální mikroflóry. S postupem onemocnění dochází k nahrazení grampozitivních fakultativně anaerobních bakterií (*Streptococcus*, *Actinomyces*) za striktně anaerobní gramnegativní bakterie (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga ochracea*, *Treponema denticola*).

Parodontitida probíhá 10–15 let, za střídání období akutních exacerbací a remisí. Prevalence onemocnění je vysoká – postihuje až 50 % dospělé populace, přičemž těžce probíhá u 5 – 15 % dospělé populace (KREJSA *et al.* 1993).

Vývoj a regulace imunitní odpovědi závisí na lokální tvorbě a množství celé řady faktorů zahrnujících např. prozánětlivé cytokiny, metaloproteinázy, prostaglandiny, které ovlivňují jak progresi onemocnění tak i mohou vést k inhibici zánětu a k jeho stabilizaci (GEMMELL a SEYMOUR 2004).

Suspektní patogeny izolované ze zubního povlaku kontinuálně stimulují buňky parodontu k tvorbě cytokinů (BODET *et al.* 2005).

Na základě koncepce funkčních  $T_H1$  a  $T_H2$  lymfocytů navrhli SEYMOUR *et al.* 1993 hypotézu onemocnění parodontu, podle které pacienti u nichž onemocnění progreduje, tvoří po aktivaci bakteriemi převážně klony lymfocytů  $T_H2$ , zatímco stabilní léze jsou regulovány klony  $T_H1$ . Tato hypotéza byla potvrzena i na našem pracovišti (BÁRTOVÁ *et al.* 2000, KRÁTKÁ *et al.* 2006)

V posledních letech dochází k intenzivnímu výzkumu genetického podkladu onemocnění, zejména některých kandidátních genů spojených s prozánětlivou a remodelační aktivitou – např. některé geny pro cytokiny a metaloproteinázy (HOLLÁ *et al.* 2004a, IZAKOVIČOVÁ – HOLLÁ *et al.* 2005).

Je pravděpodobné, že funkční polymorfismy v genech pro některé typy cytokinů a dalších faktorů mohou ovlivňovat velikost produkce příslušných mediátorů a mohou být důležitým faktorem v etiopatogenezi parodontitidy.

### **Cíle diplomové práce:**

1) Předkládaná diplomová práce je součástí výzkumného projektu, kterým chceme, na základě studia polymorfismů v genech prozánětlivých a remodelačních faktorů ve vztahu k regulaci imunitní odpovědi a klinickému stavu parodontu, upřesnit rizikové faktory parodontitidy. Rádi bychom přispěli k řešení otázky rizika onemocnění parodontu a navrhli preventivní řešení.

2) Zavedení multiplexové analýzy cytokinů metodou LUMINEX a její následné aplikace. Metoda nám umožňuje rychlé stanovení koncentrace velkého počtu cytokinů v malém množství vzorku. Domníváme se, že důkladné poznání funkcí jednotlivých cytokinů a jejich vzájemných funkčních interakcí přinese velký praktický význam pro fyziologické a patologické reakce organismu.

V naší práci jsme se zaměřili především na sledování tvorby cytokinů (IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) po stimulaci z periferní krve izolovaných mononukleárních buněk (mitogeny, bakteriemi zubního povlaku nebo HPS proteiny) u pacientů s chronickou parodontitidou.

3) Tato práce je první částí pilotního projektu, který bude i nadále pokračovat. Celkový význam projektu spatřujeme v tom, že nám umožní zhodnotit vztah mezi polymorfismem genů pro cytokiny, tvorbou cytokinů důležitých v rozvoji a regulaci imunitní odpovědi a klinickými nálezy u pacientů s parodontitidou.

„Na prahu 21. století se však musíme vrátit k základnímu poznání, že vnímavost pacienta rozhodne o tom, jaká bude konečná míra poškození parodontu a jak úspěšná bude použitá terapie, (SEYMOUR *et al.*1996).

# **PŘEHLED SOUČASNÝCH POZNATKŮ**

## **1. STAVBA PARODONTU**

## **2. ONEMOCNĚNÍ PARODONTU**

- Příčiny vzniku onemocnění a rozvoje parodontitidy
- Mechanismus resorpce alveolární kosti

## **3. TYPY PARODONTITIDY**

## **4. RIZIKOVÉ FAKTORY PARODONTITIDY**

- Genetická predispozice
- Zubní povlak a bakterie
- Porucha funkce polymorfonukleárů
- Korelace s dalšími chorobami

## **5. IMUNITNÍ MECHANISMY PARODONTITIDY**

- Mechanismy nespecifické imunity
- Mechanismy specifické imunity
- Cytokiny a stav parodontu

## **4. PŘEHLED SOUČASNÝCH POZNATKŮ**

### **4.1. STAVBA PARODONTU (Obr.1)**

#### **4.1.1. Dutina ústní**

Dutina ústní, místo vstupu do trávicího ústrojí, je značně exponovaná vnějším podnětům. Za fyziologického stavu jsou cizorodé látky odstraňovány ze slizničních povrchů pomocí slin, se kterými jsou odplavovány do distálních částí zažívacího traktu. Sliznice ústní dutiny tvoří bariéru proti průniku poškozujících látek, jsou zde přítomné humorální obranné faktory, zejména sekreční IgA a lysozym.

#### **4.1.2. Parodont**

Parodont, soubor tkání, které obklopují zub, tvoří s ním funkční celek a připojují ho k alveolární kosti. Sestává se z gingivy, epitelu, zubního cementu, parodontálních vazů, kosti alveolárního výběžku a příslušného nervově cévního zásobení.

Hlavním úkolem parodontu je zakotvení zubů v kosti, tlumení žvýkacích sil, obrana proti vnějším noxám a oddělení prostředí dutiny ústní a kořene zubu.

#### **4.1.3. Gingiva**

Gingiva (dásěň) je součástí ústní sliznice, kryje část ozubeného alveolárního výběžku. Koronárně přisedá jako vplná gingiva ztenčeným okrajem ke sklovině na povrchu zubní korunky.

U normálního parodontu gingiva sleduje průběh cementosklovinné hranice, kterou na jednotlivých zubních ploškách přesahuje asi o 2 mm. Makroskopicky ji můžeme rozdělit na volnou, připojenou (alveolární) a interdentální. Hranice mezi volnou a připojenou gingivou leží ve výšce cemento-sklovinné hranice a je u 30–40 % dospělých znatelná jako gingivální rýha (sulkus).

Volná i připojená gingiva jsou pevné konzistence světle růžové barvy bez prosvítajících krevních kapilár (u lidí s tmavou pletí je hnědě pigmentovaná).

Volná gingiva je u zdravého parodontu asi 1mm široká, jemně dolíčková a její okraj je chráněn klenutím boční stěny zubní korunky.

Připojená gingiva, její "šíře" je variabilní nebo nemusí být vůbec přítomna. Chybět může primárně nebo k její redukci až vymizení může dojít sekundárně v průběhu některých chorob parodontu, spojených se ztrátou tkání. (např. při parodontitidě, gingiválních recesech).

Interdentální gingiva – gingiva vyplňující prostor mezi dvěma zuby.

Cévní zásobení gingivy zajišťují arteria alveolaris superior posterior a arteria alveolaris interior, tyto cévy se podílejí také na zásobování zubů.

#### **4.1.4. Spojovací epitel (SE)**

Spojovací epitel, slouží k připojení gingivy na zub, vzniká přeměnou z redukovaného sklovinného epitelu. Rozpíná se okolo zubu od cemento-skloviné hranice až na dno gingiválního sulku. Výška SE činí u zdravého parodontu 1,5–2 mm, šířka 0,1 mm a je tvořen asi z 12–18 vrstev nerohovatějících buněk. Důležitými faktory jsou obrovská reparační schopnost buněk, uplatňujících se prakticky trvale při obranných pochodech a schopnost regenerace. SE s přilehlou vazivovou složkou se označuje jako gingivodentální uzávěr a představuje nejzanitelnější místo parodontu.

#### **4.1.5. Dásňový epitel**

Dásňový epitel kryje povrch gingivy. Představuje bariéru, která odděluje vnitřní prostředí a zabraňuje pronikání cizích složek do tkáně. Je zodpovědný za transport živin.

#### **4.1.6. Vazivo dásně**

Vazivo dásně se skládá z řídkého vaziva a svazků kolagenních vláken. Řídké vazivo je tvořeno asi z 80% vodou, která je nezbytná pro udržení homeostázy ve tkáni a asi z 8% buňkami. Zbytek tvoří kolagenní fibrily. Z buněk jsou nejpočetnější fibroblasty. Fibroblasty jsou producenti všech složek vaziva a hrají ústřední roli i obnově dásňového vaziva. Zároveň jsou schopné migrovat do místa poškození a fagocytovat poškozený kolagen (LISGARTEN 1973).

Ve zdravé dásni se kromě fibroblastů nacházejí též mastocyty a makrofágy, které pod spojovacím epitelem vytvářejí ochranný pás. Součástí imunologické bariéry, která přispívá spolu se sulkulární tekutinou, vymývající dásňový sulkus, k obraně spojovacího epitelu, jsou také lymfocyty a plazmatické buňky přítomné v zóně pod tímto epitelem. Další funkční bariéru proti pronikání škodlivin vytváří základní viskózní hmota gingiválního vaziva.

#### **4.1.7. Parodontální vazy, alveolární kost**

Parodontální vazy kotví zub v zubním lůžku (alveolus) a nacházejí se v parodontální štěrbině mezi zubním cementem a kompaktní alveolu.

Alveolární kost je vysoce metabolicky aktivní. Je-li zatěžována v souladu se svou fyzickou funkcí, prodělává plynulou přestavbu. Dorůstá výšky alveolárního hřebene.

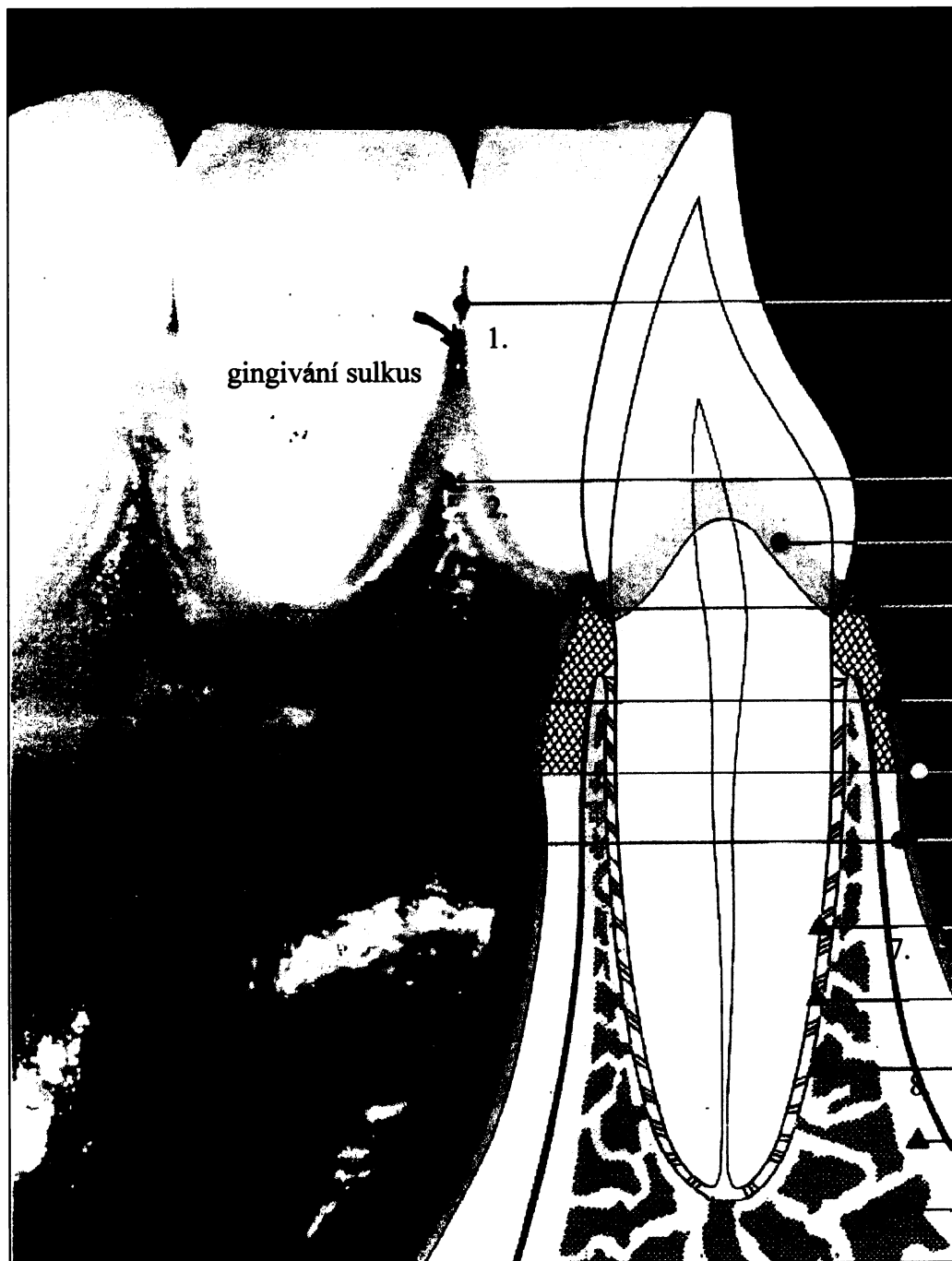
#### **4.1.8. Cement**

Zubní cement je anatomickou součástí zubu a zároveň funkční součástí parodontu. Je to hrubě vláknitý typ kosti s poměrem 1:1 organických a anorganických látek. Pokrývá kořen zubu. Jeho hlavní funkcí je připojení parodontálních vazů k zubnímu kořeni. Během života nepodléhá funkční remodelaci ani různým kostním patologickým procesům.

Z hlediska vzniku parodontitidy je nejdůležitější oblastí část parodontu, kde spolu anatomicky sousedí povrch zubu (sklovina, cement) a gingiva (epitel, vazivo).



Obr.č.1: Stavba parodontu (RATEITSCHAK 1989)



1. Kontaktní bod
2. Mezizubní papila
3. Spojovací epitel
4. Volná gingiva
5. Připojení gingiva
6. Alveolární sliznice
7. Parodontální vazy
8. Alveolární kost

## 4.2. ONEMOCNĚNÍ PARODONTU

### 4.2.1. Příčiny vzniku a rozvoje parodontitidy

Parodontitida je chronické multifaktoriální zánětlivé onemocnění závěsného aparátu zubů, jehož průběh ovlivňují faktory vnějšího i vnitřního prostředí paradontu. Počátky onemocnění mohou vznikat již v období puberty.

U zdravého paradontu je působení interních i exogenních faktorů v rovnováze, při narušení této rovnováhy dochází ke gingivitidě = první stadium onemocnění postihující pouze dásně (PAGE a SCHROEDER 1976). V tomto stadiu lze ještě zánětlivý proces potlačit např.: odstraněním zubního kamene a následným pečlivým a správně prováděným čištěním chrupu (KREJSA *et al.* 1993).

Zanedbáváním ústní hygieny dochází k hromadění zubního povlaku a tím ke zvýšenému množství bakteriálních produktů. U vnímavých jedinců přítomnost plaku podmiňuje rozvoj lokální zánětlivé reakce. Bakteriální produkty, přítomné v zubním povlaku pronikají úponovým epitelem gingivy do tkání paradontu a narušují mezibuněčné spoje. Tím je usnadněn další průnik bakterií do tkání. Bakteriální antigeny aktivují komplement, metabolismus kyseliny arachidonové, působící chemotakticky na PMN, které tvoří první obranný pás pod SE a makrofágy (ALLISON *et al.* 1976). S aktivací komplementu je spojený edém a vyšší permeabilita kapilár, která vede ke zvýšené produkci sulkulární tekutiny, která obsahuje chemoatraktivní látky pro polymorfonukleární leukocyty.

Pokud není příčina zánětlivé reakce včas odstraněna, zánět se může stát onemocněním chronickým, zejména u osob geneticky predisponovaných k parodontitidě.

Přechod gingivitidy v parodontitidu je přímo spojen s migrací zánětlivého infiltrátu do hlubších oblastí paradontu k alveolární kosti a s rozvojem především specifických imunitních mechanismů.

V průběhu nemoci dochází k postupné destrukci pojivové tkáně, zejména závěsných vazů v místě jejich napojení na zubní cement. Poškozená místa přerůstá úponový epitel, který se zároveň koronárně odlučuje od stěny zubů. Dochází k prohlubování gingiválního sulku a vzniku parodontálního chobotu. V důsledku přítomnosti infekce je na jeho dně trvalý chronický zánět, který zabraňuje spontánnímu vyhojení. Vzniká tak prostředí vhodné pro život anaerobních

mikroorganismů, které postupně osídlí zubní povlak. Původní aerobní druhy hynou a stávají se dalším zdrojem antigenů.

Resorpce alveolární kosti, která je způsobena prostřednictvím cytokinů, které stimulují osteoklasty kostní hmoty, spolu s ostatními změnami v parodontu vede ke snížení a oslabení závěsného aparátu zubů a k jejich předčasné ztrátě.

V průběhu onemocnění, které může trvat 15 až 20 let se střídají období klidu a období akutních exacerbací (KREJSA *et al.* 1993). Postiženy mohou být jen některé zuby (lokalizovaná forma onemocnění) nebo celý chrup (generalizovaná forma onemocnění).

Nejúčinnější léčbou onemocnění parodontu je konzervační terapie (KREJSA *et al.* 1993). Tato léčba spočívá v pečlivém odstranění zubního kamene stomatologem nebo dentální hygienistkou a následně správně prováděné čištění zubů, masáže dásní, používání zubní nítě a ústních vod (např. Corsodyl). V některých případech je nutné vyrovnat skus -tedy vyloučit přetěžování některých úseků chrupu či chirurgická léčba, při které se odstaní příliš zduřelé dásně.

K léčbě se používají i antibiotika, která regulují složení bakterií v ústech. Např. augmentin (širokospektré baktericidní antibiotikum penicilinového typu), entizol, tetracyklin, doxycyklin a další.

#### **4.2.2. Mechanismus resorpce alveolární kosti**

Za normálních podmínek je remodelace alveolární kosti vyvážený proces. Osteoblasty, které mají původ v pluripotentních kmenových buňkách syntetizují kostní hmotu. Oproti tomu osteoklasty, které patří do monocyto-makrofágové rodiny, diferencované z hematopoetických prekurzorů, zajišťují její koordinovanou resorpci (SUDA *et al.* 1992).

V celém procesu remodelace kosti byly popsány 3 klíčové molekuly:

- 1) RANKL – receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, (označovaný též osteoprotegerin ligand – OPGL)
- 2) jeho buňečný receptor RANK–receptor activator of nuclear factor kappa B
- 3) OPG – osteoprotegerin

RANKL (38 KDa, 3 podjednotky) patří do rodiny TNF, nalezneme ho jak v rozpustné tak i v membránové formě. Je produkován kmenovými buňkami kostní

dřeně, osteoblasty, osteoklasty, chondrocyty, endoteliálními buňkami a T-lymfocyty (HOFBAUER a HEUFELDER 2000).

Působení RANKL je zprostředkováno vazbou na jeho vysoce afinitní receptor RANK.

RANK – transmembránový protein typu I patřící do rodiny TNF receptorů. Je složený ze 616 aminokyselin a obsahuje 4 oblasti bohaté na cystein. Jeho exprese byla zjištěna u progenitorů osteoklastů a dentritických buněk. Aktivace RANK zahrnuje: RANKL-dependentní interakci se členy rodiny TRAF (tumor necrosis factor receptor – associated factor), stimulaci c-jun N – terminální kinázy a nukleárního faktoru  $\kappa$ B (NF –  $\kappa$ B), kooperaci s protoonkogenem c-src a aktivaci antiapoptotické serin/threonin kinázy Akt/PKB (HOFBAUER A HEUFELDER 2001).

OPG je 120 KDa dimerní glykoprotein, který patří též do rodiny TNF receptorů, je charakteristický tím, že postrádá transmembránovou doménu. OPG je exprimován řadou tkání a buněčných typů. V kostech jej produkují osteoblasty, přičemž jeho produkce stoupá spolu s pokračující diferenciací buněk. Funkcí OPG je vazba a neutralizace volné i vázané formy RANKL, čímž inhibuje zrání a aktivaci osteoklastů.

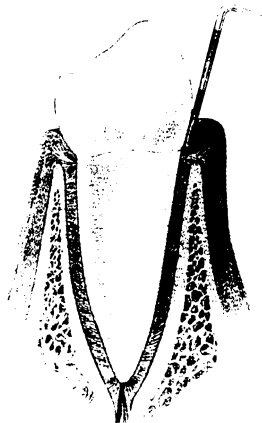
Nerovnováha v systému RANKL/RANK/OPG vede k nadměrné resorpci kostní tkáně, která indikuje její poškození u mnoha onemocnění např.: u Pagetovy choroby, reumatoidní artritidy a parodontitidy.

V případě parodontitidy se jedná o modulaci RANKL a OPG prozánětlivými cytokiny. Hlavním mediátorem je IL-1 $\beta$ .

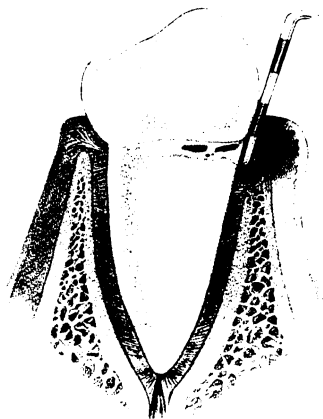
**Obr.č.2: Vývoj zánětu dásně**

1.gingivitida, 2., 3., 4 postup zánětu končící parodontitidou

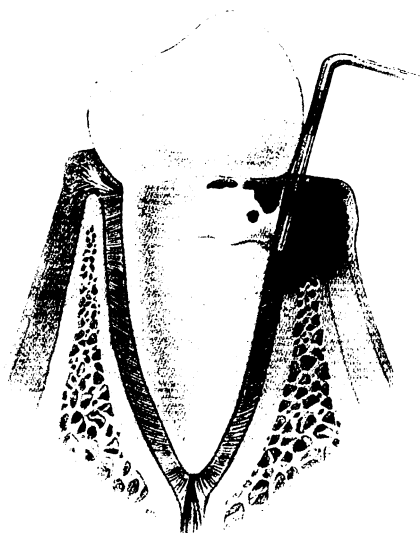
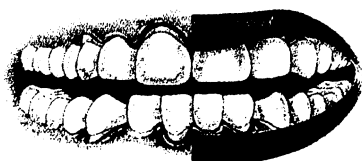
1.



2.



3.



4.



### 4.3. TYPY PARODONTITID

V průběhu posledních desetiletí prošla klasifikace parodontitid řadou změn. (Tab.č.1). V České republice se v současné době používá klasifikace, která byla schválena v roce 1989 na Světové konferenci klinické parodontologie (American Academy of Periodontology 1989). Po zjednodušení této klasifikace v roce 1994 na 1. evropském parodontologickém kongresu (ATTSTRÖM a VAN DER VELDEN 1994) byl v roce 1999 na Mezinárodním parodontologickém kongresu přijat nejnovější klasifikační systém (ARMITAGE 1999).

V následujícím přehledu parodontálních onemocnění jsou uvedeny pouze hlavní zástupci.

**Tab.č.1: Klasifikace parodontitid**

|  |
|--|
| <b><u>Světový kongres klinické parodontologie (1989)</u></b> |
| Parodontitida dospělých                                      |
| Časná parodontitida  |
| A) Prepubertální parodontitida                               |
| B) Juvenilní parodontitida – generalizovaná, lokalizovaná    |
| C) Rychle progredující parodontitida                         |
| Parodontitida asociovaná se systémovým onemocněním           |
| Nekrotizující ulcerativní parodontitida                      |
| Refraktorní parodontitida                                    |
| <b><u>1.evropský parodontologický kongres (1994)</u></b>     |
| Časná parodontitida  |
| Parodontitida dospělých                                      |
| Nekrotizující parodontitida                                  |
| <b><u>Mezinárodní parodontologický kongres (1999)</u></b>    |
| Onemocnění gingivy   |
| Chronická parodontitida – lokalizovaná, generalizovaná       |
| Agresivní parodontitida – lokalizovaná, generalizovaná       |
| Parodontitida jako projev systémového onemocnění             |
| Nekrotizující onemocnění parodontu                           |
| Parodontální absces  |
| Parodontitida spojená s endodontickými lézemi                |
| Vývojové a získané deformity                                 |

#### **4.3.1. Chronická gingivitida**

Chronická gingivitida je charakterizována zánětem dásně bez parodontálních chobotů, detekovatelné ztáty alveolární kosti či poruchy závěsného aparátu.

Příčinou může být nahromadění zubního plaku, zvýšené hladiny steroidních hormonů nebo léčba některými léky.

Vyskytuje se již u dětí. Nejzávažnější je v období puberty s věkem její výskyt klesá (STAMM 1986).

#### **4.3.2. Parodontitida dospělých (AP–adult periodontitis)**

AP postihuje 70-80 % dospělé populace. První klinické známky onemocnění se objevují kolem 30. roku života a s přibývajícím věkem se počet nemocných zvyšuje (RATEITSCHAK *et al.* 1989). Ve většině případů dochází k pomalé a nepravidelné destrukci alveolární kosti u všech zubů, nejčastěji u frontálních zubů a molárů (RATEITSCHAK *et al.* 1989). U pacientů s AP byl pozorován vyšší poměr CD4/CD8 lymfocytů (TAKAHASHI *et al.* 1995).

V etiologii tohoto onemocnění se uplatňují ve vyšší míře vlivy exogenních faktorů (zubní povlak, kouření, osteoporóza) před genetickými faktory, bývá proto úspěšná léčba konservativní terapií (PROCHÁZKOVÁ *et al.* 1996).

Onemocnění trvá dlouho se střídáním období klidu a období skutečných zdravotních obtíží (RATEITSCHAK *et al.* 1989).

#### **4.3.3. Časná parodontitida – (EOP – early onset periodontitis)**

EOP – onemocnění je charakterizované jako počáteční změny na parodontu, které se mohou rozvinout v lokalizovanou či generalizovanou formu. Onemocnění má podobným fenotyp, ale více forem lišících se genetickým, bakteriologickým i imunitním projevem (MICHALOWITZ 1994).

Všechny typy onemocnění, zahrnované pod označení EOP, mají genetický podklad. Řada prací se shoduje, že přenos časně parodontitidy v rodinách se děje prostřednictvím jednoho genu.

#### 4.3.3.1. Prepubertální parodontitida (PP-prepubertal periodontitis)

PP je nejtěžší formou zánětlivého onemocnění parodontu s velmi rychlou progresí. Vyskytuje se u dětí již ve věku 5-8 let, u kterých postihuje mléčný i smíšený chrup (PAGE *et al.* 1983). Prevalence onemocnění je 0,84 – 4,5 % v závislosti na použití diagnostických kritérií (WATANABE 1990, MEYLE 1994).

Pro PP je charakteristické: zánět dásně, rychlá ztráta alveolární kosti, viklavost až uplná ztráta zubů. Vyskytuje se jak v lokalizované formě, kdy postihuje < 30 % zubů tak i v generalizované formě, která postihuje > 30% zubů.

Mezi rizikové faktory patří např. porucha funkce polymorfonukleárních leukocytů (ALTMAN *et al.* 1985).

Vznik prepubertální parodontitidy je ve značné míře podmíněn geneticky. Přenáší se autozomálně recesivně. Ve většině případů ji nacházíme u pacientů, kteří mají diagnostikované závažné systémové onemocnění, např. diabetes mellitus I.typu, Papillon – Lefévrův syndrom, Downův syndrom, AIDS atd. (PAGE *et al.* 1983).

Léčba bývá úspěšná pouze u lokalizované formy onemocnění (PROCHÁZKOVÁ *et al.* 1996).

#### 4.3.3.2. Juvenilní parodontitida (JP–juvenile periodontitis)

JP postihuje jedince kolem 13ti let, kteří netrpí systémovým onemocněním. Progreduje s nástupem puberty, později se střídají období klidu a aktivity. Vyskytuje se v lokalizované i generalizované formě.

U lokalizované formy JP dochází za přítomnosti slabého zánětu dásní ke kráterovité resorpci alveolární kosti pouze u prvních stoliček a řezáků.

U generalizované formy JP je zasažena většina zubů horizontální resorpcí alveolární kosti.

Přibližně u 75% pacientů s JP jsou detekovány poruchy funkce chemotaxe a fagocytózy PMN leukocytů (VAN DYKE 1995).

Prevalence onemocnění je 0,1 % - 15 % (SJÖDIN *et al.* 1993, HART *et al.* 1997).



Výskyt onemocnění je častější v méně rozvinutých zemích a byl pozorován častěji u afroamerické (10%) a latinskoamerické (5,5%) populace než u bělochů (1,3 %) (ALBANDAR *et al.* 1997).

Dědičnost tohoto onemocnění je autozomálně recesivní, někteří autoři uvádějí vazbu na X chromozóm (RATEITSCHAK *et al.* 1989, PROCHÁZKOVÁ *et al.* 1996).

#### 4.3.3.4. Parodontitida mladšího dospělého věku s rychlou progresí onemocnění

##### (RPP – rapidly progressive periodontitis)

RPP onemocnění s rychlým průběhem, které vede k předčasné ztrátě zubů u mladých jedinců. První známky onemocnění se objevují mezi pubertou a 30. rokem. U pacientů dochází k rychlejší horizontální nebo pomalejší vertikální ztrátě alveolární kosti. Prevalence onemocnění je 2 – 5 % populace.

Významnou roli hraje genetická predispozice vázaná na X –chromosom (RATEITSCHAK *et al.* 1989, PROCHÁZKOVÁ *et al.* 1996) a porucha funkce PMN buněk a monocytů (PROCHÁZKOVÁ *et al.* 1996). Nacházíme ji jak v lokalizované tak i v generalizované formě.

V roce 1999, kdy bylo přistoupeno k dnes nejnovější klasifikaci parodontitid (ARMITAGE 1999) byl termín parodontitida dospělých nahrazen termínem chronická parodontitida, přičemž do této kategorie jsou zařazeni i mladší pacienti s chronickým průběhem onemocnění. Nachází se v lokalizované (postihuje < 30 %) i generalizované (postihuje > 30 %) podobě. Závažnost onemocnění můžeme hodnotit též dle CAL indexu na mírnou (CAL 1-2 mm), středně závažnou (CAL-3 –4) až závažnou formu (CAL > 5). CAL index (clinical attachment loss) – vypovídá o míře ztráty úponu.

Dalším termínem, který je nahrazen je termín časná parodontitida. Časná parodontitida je nahrazena agresivní parodontitidou (ARMITAGE *et al.* 1999).

Pro agresivní parodontitidu je charakteristická rychlá progresse – postižen bývá závěsný aparát, dochází k rychlé resorpci alveolární kosti. U pacientů není diagnostikováno systémové onemocnění. Ve většině případů je detekována porucha funkce polymorfonukleárních buněk a zvýšená produkce prostaglandinu

E<sub>2</sub> a IL-1β. Můžeme ji rozdělit do dvou kategorií – lokalizovanou a generalizovanou a dále pak na mírnou, střední až těžkou formu.

Novým pojmem zavedeným v roce 1999 je „Parodontitida jako projev celkového onemocnění,, (ARMITAGE 1999). Do této kategorie jsou zařazováni pacienti s parodontitidou, kteří mají navíc systémové onemocnění, které ovlivňuje stav paradontu např. diabetes mellitus I. typu, Downův syndrom, AIDS atd.

#### **4.4. RIZIKOVÉ FAKTORY VZNIKU PARODONTITIDY**

Zásadní vliv na vznik parodontitidy má porucha v souhře vnějších a vnitřních etiologických faktorů. Hlavním vnitřním faktorem je genetická predispozice a změněná imunitní reakce, hlavním vnějším faktorem je působení bakterií zubního plaku.

Podíl vnějších faktorů v etiologii onemocnění narůstá a podíl genetických faktorů klesá v pořadí od prepubertální parodontitidy přes juvenilní a rychle progredující parodontitidu až k parodontitidě dospělých. Se zmenšujícím se podílem genetických faktorů klesá závažnost onemocnění i rychlost progresu úspěšnost terapie naopak vzrůstá.

##### **4.4.1. Genetická predispozice**

Genetické faktory jsou považovány za přední činitele zodpovědné ve více než 50–ti % případů za vznik parodontitidy (MICHLOWITZ *et al.*1991). Primární citlivost k rozvoji onemocnění je dána genotypem každého jedince (MICHLOWITZ *et al.*1994). V patogenezi tohoto onemocnění se mohou uplatňovat mutace řady genových lokusů. Prepubertální parodontitida, lokalizovaná agresivní parodontitida a generalizovaná agresivní parodontitida jsou pravděpodobně způsobeny mutací v genech, které jsou děděny autozomálně dominantně s redukovanou penetrací. To znamená, že je zde přítomno několik genových lokusů, jejichž mutací může dojít k rozvoji onemocnění, u nositele rizikové mutace může, ale nemusí onemocnění propuknout, záleží na přítomnosti dalších rizikových faktorů (MARAZITA *et al.*1994, KINANE a HART 2003).

Vývoj a regulace imunitní odpovědi v patogenezi parodontitidy jsou do značné míry genově specifické a v závislosti na lokální tvorbě cytokinů či expresi dalších biologicky aktivních látek.

Geneticky podmíněná dědičnost kromě vzniku a rozvoje parodontitidy ovlivňuje i funkci PMN a monocytů. Dochází k poruchám fagocytózy, chemotaxe, enzymovým defektům a také k defektům v expresi povrchových molekul spojeným se ztrátou adhezivity a migrace.

Genetické faktory mohou rovněž ovlivňovat protilátkovou odpověď na bakterie přítomné v zubním povlaku. Současné znalosti genetického pozadí parodontitidy jsou stále velmi omezené a neumožňují na základě genetického vyšetření vytipovat rizikové skupiny pacientů (LOOS *et al.* 2005). Velmi významné je proto dlouhodobé klinické sledování sourozenců pacientů s časnou parodontitidou. Patří mezi jedince s vysokým rizikem rozvoje onemocnění parodontu a je tedy u nich možné včas zachytit počáteční změny na parodontu a zahájit léčbu.

Intenzivní práce probíhá na vytvoření tzv. „High risk“ genového profilu, který by mohl být použit při screeningovém vyšetření pacientů (KINANE a HART 2003).

#### **4.4.2. Zubní povlak a bakterie**

Přítomnost zubního povlaku je nezbytným předpokladem vzniku parodontitidy. ZAMBON (1995) uvádí, že v patogenezi onemocnění nehraje úlohu jeden patogen, ale interakce bakterií a superantigenů zubního povlaku.

SOCRANSKY *et al.* (1965) zjistili, že 1g povlaku obsahuje až  $1,7 \cdot 10^{11}$  mikroorganismů. Ze 300- 400 druhů bakterií detekovaných v zubním povlaku hraje v destrukci parodontu významnější úlohu jen asi 10-20 druhů (ZAMBON a TEMPRO 1995, PAGE 1999).

Zubní povlak je charakterizován jako měkký povlak, který pokrývá povrch zubů v důsledku nedostatečného samoočišťování při špatné ústní hygieně (ŠKACH *et al.* 1984).

Je organizován jako biofilm (COSTERTON *et al.* 1994). Tvoří jej různé bakteriální druhy, které se k sobě specificky vážou pomocí řady adhezivních molekul a receptorů. Uplatňují se vazby mezi lektinovou molekulou na povrchu

jednoho bakteriálního druhu a sacharidovým epitopem druhého bakteriálního druhu (SOCRANSKY *et al.* 1991). V biofilmu se vytvářejí mikroprostředí s odlišným pH. Je to způsobeno tím, že každá z bakterií má odlišné vlastnosti. Uplatňují sice vzájemnou spolupráci v metabolických procesech, ale každá z bakterií produkuje řadu odlišných proteinů. Dohromady jsou obklopeny intermikrobiálními substancemi, která napomáhá jejich soudržnosti, je zásobárnou živin a má i ochranný účinek. Biofilm je mnohem odolnější vůči působení imunitního systému a antibiotik než jednotlivé bakterie a zároveň představuje pro organismus dlouhodobý zdroj antigenních podnětů.

Bakterie jsou i v přítomnosti specifických protilátek a komplementu vysoce odolné k fagocytoze a cytotoxickému působení PMN stejně tak k působení léků s antibakteriálním působením (COSTERTON *et al.* 1994, PAGE *et al.* 1999).

Studie prováděné na počátku 60 let prokázaly, že spektrum bakterií i množství subgingiválního plaku je v místech s porušeným a zdravým parodontem odlišné, byla prokázána též odlišnost spektra bakterií zastoupených v parodontálních chobotech v závislosti na hloubce parodontálních chobotů a stupni zánětu (ZAMBON a TEMPRO 1995, SOCRANSKY *et al.* 1998).

Ve zdravé ústní dutině mezi nejhojnějšími bakteriemi patří grampozitivní fakultativně anaerobní rody např.: *Streptococcus*, *Actinomyces*.

V místech s tvorbou parodontálních lézí dochází ke kumulaci většího množství zubního povlaku a v mikrobiální flóře převládají gramnegativní anaerobní druhy (MACDONALD *et al.* 1960, SOCRANSKY *et al.* 1963).

Např. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga ochracea*, *Treponema denticola*.

Jak grampozitivní tak i gramnegativní bakterie obsahují množství strukturních i sekrečních komponent, které buď přímo poškozují tkáň parodontu nebo stimulují imunitní systém hostitele. Imunitní odpověď, která je mířená proti infekci, však zároveň vede k další destrukci tkáně (MADIANOS *et al.* 2005).

Buněčná stěna gramnegativních bakterií je tvořena peptidoglykany, polysacharidy, proteiny, lipidy, lipopolysacharidy a lipoproteiny (MADIANOS *et al.* 2005). U grampozitivních bakterií je složena z peptidoglykanů, kyseliny teichoové a polysacharidů. Řada z těchto proteinů obsahuje konzervovanou sekvenci, PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern), která je rozpoznávána

buňkami imunitního systému prostřednictvím povrchových receptorů – PRR (Pattern Recognition Receptors). Tyto receptory rozeznávají stejné bakteriální komponenty produkované různými druhy bakterií.

### Lipopolysacharid (LPS) - endotoxin

LPS je přítomný v buněčné stěně gramnegativních bakterií. Jedné jeho složce zvané lipid A jsou přisuzovány imunomodulační účinky. Lipid A je tvořen z diglykózaminové kostry s estericky nebo amidicky navázanými mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem zodpovědným za vazbu na receptorové molekuly (MADIANOS *et al.* 2005). LPS ovlivňují imunitní reakci prostřednictvím vazby na Toll-Like receptor (TLR) – 4 (LPS z *E.coli* a *A.a.*) nebo TLR – 2 receptor (LPS z *P.gingivalis*). Po stimulaci LPS dochází k produkci zánětlivých cytokinů (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$ , IL-12, IL-10), chemokinů – Macrophage Chemoattractant Protein (MCP)-5, IL-8, Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 $\alpha$ , prostaglandinu PGE<sub>2</sub> a NO (SHAPIRA *et al.* 1998, Hirschfeld *et al.* 2001). LPS z *A.a.* významně zvyšuje expresi  $\beta_2$  integrinů a L-selektinů na granulocytech a monocytech (BLIX *et al.* 1999). LPS také stimuluje expresi kostimulačních molekul CD80/CD86 a to prostřednictvím vazby na TLR-4 a dále stimuluje molekuly hlavního histokompatibilního komplexu MHC – II, které jsou důležité v aktivaci T-buněk (MEDZHITOV 2001) a podílí se i na aktivaci komplementového systému.

### Peptidoglykany (PGN)

Peptidoglykany tvoří rigidní kostru všech bakterií (MADIANOS *et al.* 2005). U grampozitivních bakterií je peptidoglykanová vrstva zvláště mohutná. Peptidoglykan je zde vázán s kyselinou lipoteichovou. Gramnegativní bakterie obsahují pouze tenkou peptidoglykanovou síť v periplasmatickém prostoru. PGN aktivují buňky vazbou na TLR – 2 receptor, jsou rozpoznávány komplementem a specifickými receptory. Aktivují produkci TNF –  $\alpha$ , IL - 1 $\beta$ , IL - 6, IL - 8 a MIP - 1 $\alpha$  (MATTSSON *et al.* 1993, WANG *et al.* 2000) a zvyšují produkci NO v makrofázích (KENHARTARAN *et al.* 1998). Ve srovnání s LPS nejsou PGN tak silnými stimulatory imunitní reakce.

## Proteázy

Proteázy jsou enzymy štěpící proteiny. Jsou produkovány řadou bakterií a klasifikovány podle jejich katalytické funkce. Nejvíce prostudované proteázy v souvislosti s parodontitidou jsou arginin – gingipain (Rgp) a lysin-gingipain (Kgp) proteázy. Řadíme je mezi cysteinové proteázy produkované *P. gingivalis*, které štěpí proteiny za argininem nebo lysinem. Primárním cílem štěpení je získat peptidy a aminokyseliny potřebné k přežití bakterie. Dále však též štěpí řadu důležitých molekul na povrchu buněk nebo v jeho okolí a tím chrání *P. gingivalis* před imunitní reakcí. Štěpí IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6 (ZHANG *et al.* 1999, FLETCHER *et al.* 1997) povrchové molekuly ICAM – 1 (Intracelular Adhesion Molekule) na epitelových buňkách (TADA *et al.* 2003), CD14, LBP (lipopolysaccharide binding protein) molekuly na povrchu monocytů a fibroblastů (TADA *et al.* 2002), složky komplementu a degradují imunoglobuliny (SUNDQUIST *et al.* 1985).

Vztah mezi přítomností patogenních bakterií a stavem parodontu dosud není zcela objasněn - patogeny se nacházejí jak u pacientů tak v místech nezasazeného parodontu u zdravých lidí. Poškozující účinky jsou pravděpodobně dány jejich rozdílnou virulencí (ALI *et al.* 1997).

### **4.4.3. Porucha funkce polymorfonukleárů (PMN)**

Polymorfonukleární leukocyty se jako první buňky obranné linie proti bakteriím zubního povlaku, dostávají do místa antigenní zátěže migrací, která zahrnuje celou řadu dílčích pochodů. Aktivované PMN na svém povrchu exprimují molekulu glykoproteinu Sial-Lewis (CD15), který adhezuje na E-selektinové receptory na povrchu aktivovaného endotelu. PMN se kutálejí po endotelu do míst, kde jsou expimovány molekuly integrinů. Následnou vazbou mezi CD11/18 rodinou receptorů na povrchu PMN a ICAM-1 adhezivní molekulou na endotelu je umožněna migrace PMN endotelem do míst antigenní zátěže.

U onemocnění LAD (defekt leukocytární adherence) jsou abnormality těchto receptorů autosomálně recesivní.

Rozlišujeme:

- **LAD I syndrom** – při kterém dochází k minimální expresi CD11/18 molekul na povrchu PMN. PMN buňky neexprimují  $\beta_2$  řetězec integrínů, které jsou nezbytné pro jejich zachycení na stěně cév v místě zářetu.

- **LAD II syndrom** – dochází k abnormální expresi Sial-Lewis molekul (CD15). Pacienti jsou náchylní k rekurentním infekcím. Důsledkem defektů v expresi povrchových molekul je potlačení buněčné chemotaxe a fagocytózy.

Mezi další onemocnění, daná poruchou PMN patří chronická granulomatozní nemoc při které je narušen oxidativní metabolismus PMN buněk.

#### 4.4.4. Korelace s dalšími chorobami

Parodontitida představuje závažné riziko pro rozvoj dalších systémových onemocnění (RENVERT 2003). Mezi nemoci doprovázející onemocnění parodontu patří některá systémová onemocnění, která se vyznačují stejně jako parodontitida, poruchami neutrofilních granulocytů. Patří sem např.:

- **Downův syndrom** – dochází k postižení genu pro adhezivní molekuly, trisomie 21. chromosomu.

- **Diabetes mellitus** – projevující se vyšší aktivací IL-1, onemocnění zahrnující rozličné formy poruch metabolismu glukózy pro které je společné absolutní nebo relativní nedostatek inzulínu. Což způsobuje zvýšenou koncentraci glukózy v krvi a tím dochází vedle porušení hojení ran a zužování malých krevních cév k dalším četným patologickým změnám.

- **Pappillon – Lefévrův syndrom** – onemocnění způsobené poruchou aktivace T – lymfocytů, způsobeno mutací genu pro cathepsin, která vede k abnormální keratóze (GORLIN *et al.* 2001). Projevuje se imunodeficitem a parciálním albinismem.

- **Chediak – Higashi syndrom** – onemocnění imunitního systému způsobené poruchou chemotaxe a baktericidních mechanismů neutrofilních granulocytů, které ústí v chronické infekce. Onemocnění je doprovázeno sníženou pigmentací kůže, očí a neurologickými problémy. V důsledku komplikací dochází k předčasnému úmrtí. Onemocnění je autozomálně recesivní (TEMPLE *et al.* 1972, SHIBUTAMI *et al.* 2000).

Parodontitida je také spojována s plicními infekcemi (RENVERT 2003). U těhotných žen může rozvinutá parodontitida způsobit předčasný porod (KONOPKA 2004, OETTINGER *et al.* 2005) případně může negativně ovlivnit porodní hmotnost dítěte (OFFENBACHER *et al.* 1996, DASANAYAKE *et al.* 1998).

Pacienti s těžkou parodontitidou mají zvýšené riziko rozvoje aterosklerózy, infekce myokardu a mozkové příhody (DE STEFANO *et al.* 1993).

#### 4.4.4.1. Parodontitida jako rizikový faktor aterosklerózy

Parodontitida se řadí mezi rizikové faktory pro rozvoj aterosklerózy a cerebrovaskulárních onemocnění. Vztah mezi parodontitidou a aterosklerózou byl prokazován teprve v posledních letech. Experimentálně jej prokázali EBERSOLE *et al.* (1994).

V anglické odborné literatuře se setkáváme s pojmem PAS – parodontoso - aterosklerotický syndrom.

CHUNG *et al.* (2003) zjistili v sérech u pacientů s prokázanými aterosklerotickými změnami zvýšenou hladinu HSP 60. Experimenty na zvířatech naznačují, že infekce může vést ke zvýšené tvorbě protilátek reagujících s HSP 60. Vazba těchto protilátek na HSP 60 exprimovaných na endotelu cévy v místě její bifurkace by mohla být spouštěcím mechanismem zánětu (WICK 2000). Mezi HSP bakterií zubního povlaku a HSP tkáně byla prokázána křížová reakce.

CARRINNII *et al.* (2000) zjistili přítomnost *Porphyromonas gingivalis* v aterosklerotických lézích. CHIU (1999) potvrdil přítomnost bakterií *P. gingivalis* a *Streptococcus sanguis* v aterosklerotických plátech ve vzorcích cév odebraných při chirurgické rekonstrukci cévního řečiště. Pomocí PCR reakce byly v aterosklerotických plátech detekovány mikrobiální ribozomální RNA (rRNA) a DNA bakterií *P.gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* a *P. intermedia* (HARASZTHY *et al.* 2000, TAYLOR – ROBINSON *et al.* 2002, FIEHN *et al.* 2005, FORD *et al.* 2005).

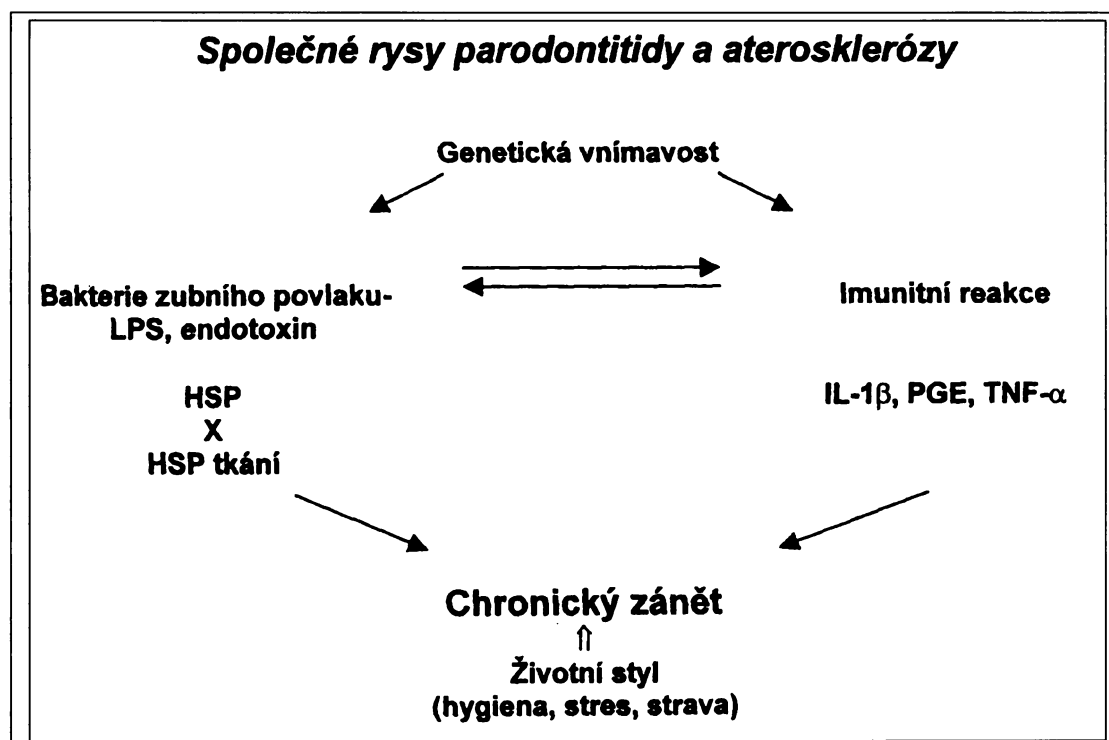
Vztah mezi aterosklerózou a *P. gingivalis* potvrdil i LALLA *et al.* (2003) použitím experimentálního modelu apo E-null myši. Rozvoj parodontitidy a aterosklerózy vyvolali orální inokulací *P.gingivalis*. V průběhu 4 měsíců se u myši vytvořily aterosklerotické proužky, v nichž byla detekována přítomnost



*P.gingivalis*. U myši s parodontitidou byly také detekovány vyšší sérové hladiny IL-6 a VCAM-1 v aortě než u myši kontrolovaných.

Pro obě onemocnění jsou společné obecné rizikové faktory jako jsou kouření, obezita, diabetes (ARMITAGE 2000). Z dlouhodobých studií vyplývá, že u pacientů s parodontitidou je 20 – 25% riziko vzniku myokardu (DE STEFANO 1993, JANKET *et al.* 2003) a 17% riziko vzniku mozkové příhody (MORRISON *et al.* 1999). Otázkou však stále zůstává zda je parodontitida příčinou nebo následkem aterosklerózy (HAYNES a STANFORD 2003).

Obr.č.3: Společné rysy parodontitidy a aterosklerózy



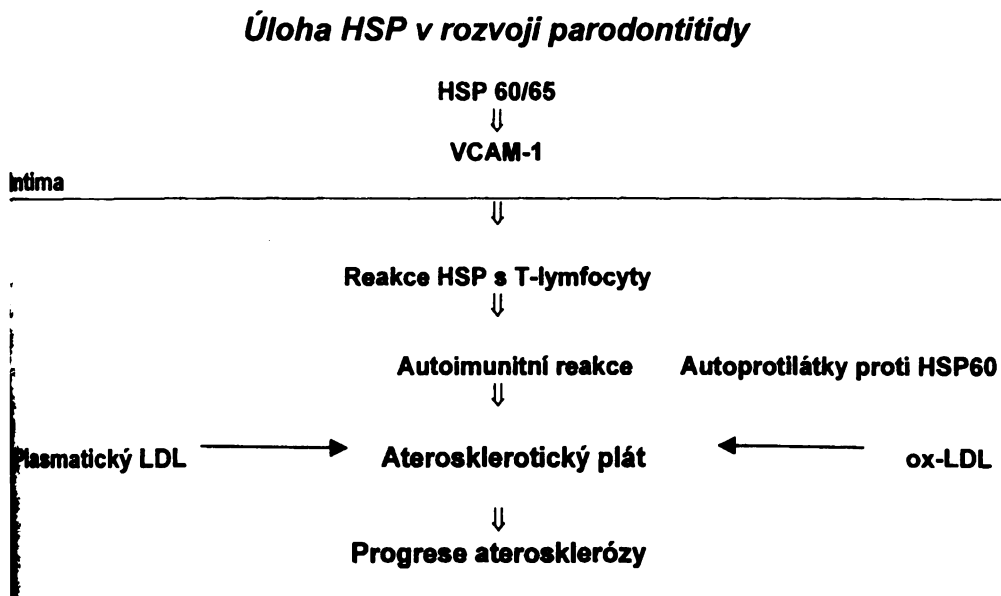
#### 4.4.4.2. Úloha HSP v rozvoji parodontitidy

Buňky reagují na stresové podmínky produkcí specifických stresových proteinů, do které patří i HSP. Mají velmi konzervativní strukturu. Na základě jejich molekulové hmotnosti (m.h.) je rozdělujeme do skupin. Některé HSP fungují jako molekulové chaperony a podílejí se na sestavování bílkovin. Jiné se podílejí na procesech nitrobuněčného zpracování, degradace bílkovin a jejich transportu.

K nejvýznamnějším patří HSP o m.h. 60kDa (GroEL) uplatňují se při sestavování multimerních bílkovinných komplexů a HSP o m.h. 70 kDa (DnaK) podílejí se na proteinových interakcích a transportu bílkovin přes membránu.

HSP stimulují zánětlivou reakci prostřednictvím vazby na CD14/TLR -4 (UEKI *et al.* 2002). Bakterie však zároveň stimulují tvorbu lidského HSP 60 v tkáni, který naopak stimuluje makrofágy a další buňky k tvorbě prozánětlivých cytokinů.

Obr.č.4: Úloha HSP v rozvoji parodontitidy



#### 4.4.4.3. Parodontitida ve vztahu k pacientům HIV pozitivních

Zvýšený výskyt onemocnění parodontu byl prokázán také u pacientů HIV pozitivních. Virus HIV (Human immunodeficiency virus) je původcem syndromu získané imunitní nedostatečnosti AIDS (Acquired ImmunoDeficiency Syndrom).

Povrchový glykoprotein gp120 HIV viru se váže prostřednictvím CD4 molekuly na T buňky a nebo prostřednictvím receptorů pro chemokiny C-CR-2, C-CR3 a C-CR-5 na makrofágy. Vazbou na receptory se spustí kaskáda reakcí vedoucí k fúzi HIV virionu s buňkou.

V infikované buňce dojde k namnožení viru a virové částice jsou následně uvolňovány do okolí pučením (KREJSEK a KOPECKÝ 2004). HIV virus je přenášen tělními tekutinami. Po infekci HIV virem dochází k rozvoji tzv. primární infekce HIV, která je provázená horečkou, únavou, bolestí kloubů a svalů. Následuje dlouhé tzv. bezpříznakové období. Poslední fází je stádium AIDS. Mezi první příznaky nástupu AIDS patří kandidózy úst a jícnu, zároveň dochází u mnoha pacientů k rozvoji maligního onemocnění Kaposiho sarkomu, který postihuje kůži, ale též sliznice a může se projevit v dutině ústní. Ačkoliv se původně předpokládalo, že pacienti HIV pozitivní mají zvýšené riziko rozvoje parodontitidy (ROBINSON 1992, American Academy of Periodontology 1996), v současné době se od tohoto názoru upouští (SMITH *et al.* 1995, HEITZ – MAYFIELD 2005).

Větší riziko představuje pro tyto pacienty léčba imunosupresivními léky, po které dochází k rychlejšímu rozvoji parodontitidy. Pacienti léčení vyššími dávkami léků vykazují 6krát častější výskyt CAL index  $> 3\text{mm}$  v průběhu 20 měsíců než pacienti léčení nižšími dávkami léků (BARR *et al.* 1992). Rychlejší postup parodontitidy je patrný u věkově starších pacientů s HIV. Nekrotizující ulcerativní parodontitida postihuje 4-6% HIV pacientů (GLICK *et al.* 1994).

#### **4.4.5. Další rizikové faktory**

Činnost imunitního systému souvisí obecně s aktuálním fyziologickým stavem organismu. Nepřekvapí nás tedy, že frekvence výskytu parodontitidy se zvyšuje s vzrůstajícím věkem (HEITZ-MAYFIELD 2005). Pro určení závažnosti a progresu onemocnění je významným kritériem vztah mezi poškozeným chrupem a věkem pacienta. Stejně hodnoty CAL indexu znamenají pro mladého pacienta horší

prognózu vývoje onemocnění než pro staršího pacienta. Nejzávažnější formy onemocnění se vyskytují v pubertě a ranné dospělosti.

Parodontitidou jsou více postiženi muži než ženy (ALBANDAR 2002). Zvláštní skupinou ohrožených osob jsou však ženy v období přechodu (NORDERYD 1993). Bylo prokázáno, že ženy ve věku 50 – 64 let, které užívají estrogenní léčbu, mají nižší krvácivost dásní než ženy bez léčby.

Výskyt parodontitidy je ovlivněn také rasou pacientů (VAN DYKE *et al.* 1970, OLIVER *et al.* 1998, ALBANDAR 2002). Častější výskyt parodontitidy byl zjištěn u afroamerické, latinskoamerické a asijské populace než u bělochů.

Mezi nejrizikovější vnější faktory patří kouření. U kuřáků byl zjištěn výskyt některé z forem parodontitidy až 6krát častěji než u nekuřáků (KORNMAN 1997). Jak konzervativní, tak i chirurgická léčba je u kuřáků méně úspěšná než u nekuřáků. Kouření snižuje krvácivost dásní, tím maskuje přítomnost zánětu a znemožňuje časnou léčbu. Inhibuje produkci specifických protilátek podtřídy IgG2 a snižuje schopnost PMN buněk fagocytovat (PAGE *et al.* 1999). Ovlivňuje složení mikroflóry – u kuřáků se vyskytuje vyšší počet parodontálních patogenů než u nekuřáků (HAFFAJEE a SOCRANSKY 2001). Pokud pacient přestane kouřit, pak dochází postupně jak k upravení imunitních mechanismů, tak ke zlepšení stavu parodontu (PALMER *et al.* 2005)

Stres ovlivňuje tvorbu humorálních faktorů a aktivuje klony T<sub>H</sub>2 lymfocytů, které vedou k progresi onemocnění (ELENKOV, CHROUSOS 1999).

## 4.5. IMUNTINÍ MECHANISMY PARODONTITIDY

Vývoj zánětlivé léze v parodontu popsali PAGE a SCHROEDER v sedmdesátých letech (1976). Produkty bakterií zubního povlaku pronikají do tkáně úponovým epitelem gingivy, v opačném směru prosakuje sulkulární tekutina. Zanedbáním ústní hygieny dochází k akumulaci zubního povlaku. Záhy po vniknutí antigenů ze zubního povlaku do tkání parodontu se vyvíjí počáteční léze aktivací humorálních a celulárních faktorů, které vedou k projevu akutního zánětu.

Akutní zánět se vyznačuje zvýšenou cévní permeabilitou a nespecifickou leukocytární obranou proti bakteriím. Cévní reakce pleteně (leží těsně pod spojovacím epitelem) je vyvolána látkami procházejícími z krevní plasmy nebo látkami uvolňovanými přímo z tkání nebo z buněk a vede ke zvýšené produkci sulkulární tekutiny a zesílenému prostupu leukocytů spojovacím epitelem (PAGE a SCHROEDER 1976).

V první fázi zánětlivé reakce se rozvíjejí převážně humorální a buněčné mechanismy nespecifické imunity - komplement, makrofágy, PMN.

Nespecifická obranná reakce není vždy dostatečně účinná proti všem antigenům. Z tohoto důvodu dochází následně k aktivaci specifické imunitní odpovědi – k aktivaci B a T lymfocytů.

### 4.5.1. Mechanismy nespecifické imunity

V průběhu gingivitidy (první fáze onemocnění parodontu) se rozvíjejí převážně nespecifické imunitní mechanismy. Z humorálních mechanismů především komplementový systém, buněčné složky PMN, makrofágy a fibroblasty (ALISON *et al.* 1976).

Komplement se do zánětlivé reakce zapojuje svými produkty, a to jak v procesu destrukce tkáně, tak i v regeneraci (BÁRTOVÁ 1989). Aktivací alternativní dráhy komplementu C3 konvertáza na povrchu mikroorganismů štěpí značné množství C3 složky na C3a a C3b podjednotky. C3b jsou vázány na povrch mikroorganismů a tím je opsonizují. C3a podjednotky spolu s C5a podjednotkami působí chemotakticky na fagocytující polymorfonukleární buňky, vaskulární permeabilitu, vasodilataci, vyvolává chemotaxi PMN buněk, degranulaci žírných buněk, aktivaci adhezivních molekul a tvorbu protilátek.

První a hlavní obrannou linii proti průniku bakterií v gingiválním sulku představují PMN buňky. Migrace PMN buněk do sulku je vysoce regulovaný proces, který zvyšuje průnik mikrobiálních složek zubního povlaku (TONNETTI 1997). Migraci ovlivňují chemotaktické složky komplementu, metabolity kyseliny arachidonové, bakteriální produkty, zvýšená exprese adhezivních molekul ve spojovacím epitelu a IL-8. PMN mají vedle fagocytózy i regulační úlohu. Po stimulaci antigeny tvoří cytokiny IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 a TNF $\alpha$ . Jsou však také zdrojem poškozujících lysozomálních enzymů. Vnímavost k některým formám parodontitidy je podmíněna právě defekty funkce PMN.

Porucha těchto buněk vede pravděpodobně k rychlejšímu nástupu zánětlivých změn v parodontu (VAN DYKE a HOOP 1990). Jedním z významných rizikových faktorů je porucha chemotaktické aktivity PMN, která byla pozorována u 70% mladých lidí s různými typy parodontitid (VAN DYKE *et al.* 1970). Průkaz změněné funkce PMN je považován za druhou nejvýznamnější práci ve 20.stol. (VAN DYKE 1970). Mezi vážné defekty patří snížená schopnost chemotaxe a zvýšená tvorba superoxidů. Soudí se, že u mladých jedinců s časnou parodontitidou se jedná o dědičný defekt neutrofilů (VAN DYKE *et al.* 1993).

PROCHÁZKOVÁ *et al.* (1995) nepozorovali při studii prováděné v roce 1992 - 93 u pacientů poruchu chemotaxe. To samé uvádí i OTČENÁŠKOVÁ (2005), která po osmi letech sledování zopakovala. Zjistila, že průměrná hodnota chemotaktických indexů pacientů se pohybovala v rozmezí fyziologických hodnot zjištěných u české populace. Také hodnoty chemotaktických indexů jednotlivých osob, zdravých i s onemocněním parodontu, se pohybovaly ve fyziologickém rozmezí. Závěrem se však domnívá, že hraniční hodnoty indexů charakterizující stav PMN buněk mohou být z hlediska rozvoje onemocnění rizikové. KRÁTKÁ *et al.* (2006) prokázala poruchu funkce PMN, kterou hodnotila jako index metabolického vzplanutí. Nižší hodnoty indexu metabolického vzplanutí, než je jeho fyziologické rozmezí, byly zjištěny na počátku léčby u 90% pacientů. Po pěti letech léčby došlo u 67% pacientů ke zvýšení jejich hodnot, přesto u 53% pacientů přetrvávala defektní funkce neutrofilních granulocytů.

Makrofágy produkují prozánětlivé cytokiny a fagocytózou odstraňují buňky poškozených tkání. Na jejich povrchovou molekulu CD 14 se váží bakteriální LPS v komplexu s LBP. Po aktivaci produkují cytokiny IL-1 $\beta$ , IL-8 a TNF $\alpha$ . Současně

s cytokiny produkují tkáňový plasminogen aktivátor, který se účastní reakcí vedoucích k aktivaci metaloproteináz (PAGE 1991).

Metaloproteinázy štěpí kolagen, který je základní součástí vaziva gingivy a parodontálních vazů. BÁRTOVÁ *et al.* (1995) zjistili, že tetracyklinovou léčbou pacientů s JP dochází k inaktivaci metaloproteináz a ke zlepšení klinického stavu parodontu s návazností na konservativní terapii.

Na povrchu fibroblastu mohou adherovat bakterie zubního povlaku a tím aktivovat cytotoxickou reakci. Adhezivní reakce se také mohou uskutečnit mezi fibroblasty a aktivovanými lymfocyty. Tato adheze stimuluje fibroblasty ke zvýšené tvorbě prozánětlivých cytokinů.

#### 4.5.2. Mechanismy specifické imunity

Lokální imunologická odpověď doprovázející onemocnění parodontu má vliv na imunitní systémovou odpověď. Proto je významné sledovat změny v imunitních reakcích také v periferní krvi pacientů. V nejvýznamnější práci 20.století týkající se tohoto tématu IVANYI a LEHNER (1970) prokázali, že lymfocyty periferní krve pacientů s gingivitidou a parodontitidou reagují, v porovnání s jedinci se zdravým parodontem, signifikantně změněnou proliferací lymfocytů periferní krve na působení bakterií považovaných za suspektní patogeny izolovaných ze zubního povlaku.

Specifickou imunitní odpověď můžeme rozdělit na humorální a buněčnou. Pojivová tkáň pacientů je infiltrována především B-lymfocyty, představitelé humorální imunity. Bylo prokázáno, že jak specifická tak nespecifická aktivace B-lymfocytů je regulována T-lymfocyty. V zánětem postiženém parodontu se vyskytuje asi 50% B-lymfocytů a 30 % T-lymfocytů (OKADA *et al.*1988). Podle tvorby cytokinů se CD4 pozitivní lymfocyty dělí na  $T_{H1}$  a  $T_{H2}$ .

$T_{H1}$  tvoří IL-2, INF –  $\gamma$ , aktivují makrofágy a jsou odpovědné za reakci oddálené přecitlivělosti. Reakce v  $T_{H1}$  směru bývá označována jako zánětlivá.

$T_{H2}$  lymfocyty produkují IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13. Poskytují B lymfocytům signály potřebné k jejich diferenciaci k tvorbě protilátek, zejména IgG1, IgE, IgA.

IL-4 se uplatňuje jako růstový faktor B lymfocytů, stimuluje tvorbu ochranných antigen specifických protilátek, které se podílejí na potlačení zánětlivé reakce. Pokud převládne tvorba polyklonálně aktivovaných protilátek, při které se mohou tvořit i

autoprotilátky, bude destrukce tkáně pokračovat.  $T_H2$  lymfocyty mají tedy jak ochranou tak destruktivní funkci.

Porucha v rovnováze tvorby  $T_H1$  a  $T_H2$  cytokinů usnadňuje průnik bakterií do tkání parodontu a může vést ke zhoršení jeho stavu. Na základě konceptu funkčních subpopulací T lymfocytů navrhli SEYMOUR *et al.* (1993) hypotézu rozvoje onemocnění parodontu. Předpokládají, že pacienti kteří nejsou k onemocnění vnímaví, tvoří v odpovědi na stimulaci antigeny převážně klony  $T_H1$  lymfocytů, zatímco pacienti, u kterých onemocnění progreduje, tvoří v odpovědi na antigenní podnět klony  $T_H2$  lymfocytů. Tato hypotéza byla potvrzena i v našem ústavu (BÁRTOVÁ 1995, 2000). Úloha  $T_H1$  a  $T_H2$  subpopulací je shrnuta na obrázku č.6.

Zánětlivé změny v parodontu představují pro bakterie zubního povlaku stresovou situaci, na kterou odpovídají tvorbou proteinů tepelného šoku (HSP).

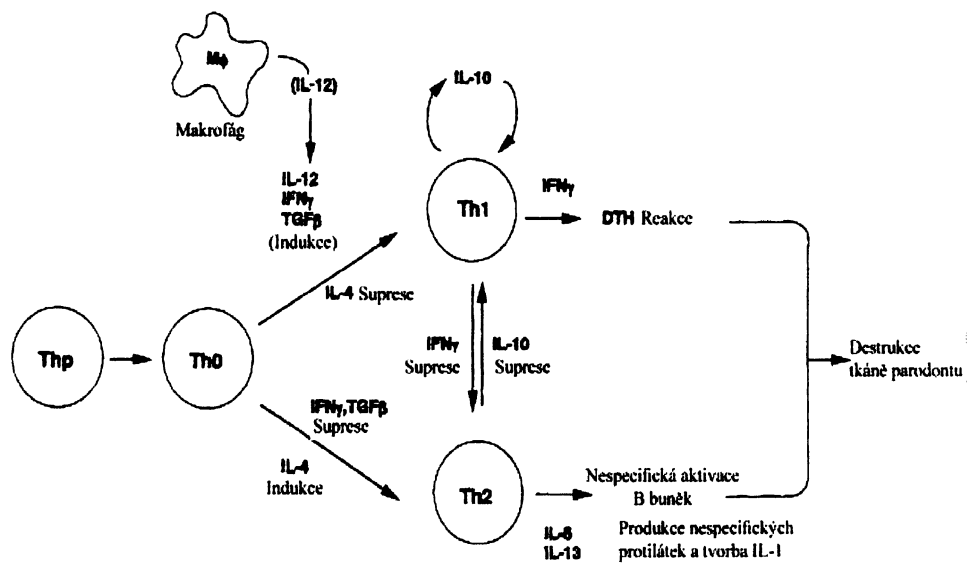
V místě zánětu v sulkulární tekutině byl zjištěn zvýšený obsah IL-1 (CHARON *et al.* 1982) Tento nálezn však nepotvrzují BÁRTOVÁ *et al.* (1995), ty uvádějí vyšší hladiny IgG v místě zánětu a také vyšší tvorbu protilátek proti kolagenu. V oblasti aktivní léze byly zjištěny vyšší hladiny IL-2, IL-6 oproti neaktivním lézím, kde zjištěny nebyly (LEE *et al.* 1995).

K tvorbě specifických protilátek jsou v místě zánětu stimulovány bakteriální antigeny. Proti povrchovým polysacharidům bakteriální stěny jsou produkovány protilátky izotypu IgG2, zatímco proti bakteriálním proteinům izotypy IgG3 (NIESENGARD *et al.* 1994).

Složky některých bakterií fungují jako významné polyklonální aktivátory. Ve tkání pacientů s parodontitidou vede tato aktivace k tvorbě imunokomplexů avšak následná cytotoxická reakce namířená proti nim poškozuje okolní tkáň (VAN DYKE *et al.* 1995).



**Obr.č.5: T<sub>H</sub>1 a T<sub>H</sub>2 reakce v patogenezi parodontitidy**  
 (OKADA a MURUKAMI 1998)



### 4.5.3. Cytokiny a stav parodontu

Cytokiny hrají důležitou roli v patogenezi parodontitidy. Cytokiny, které se nacházejí v tkáních parodontu vykazují biologickou aktivitu, následkem které dochází k aktivaci osteoklastů a fibroblastů a tím k progresi onemocnění. Mezi cytokiny patří i důležité aktivační a regulační molekuly.

Na působení cytokinů v patogenezi parodontitidy je zaměřeno množství odborných prací. OKADA *et al.* 1995 prokázali, že různé stupně zánětlivé reakce v parodontu jsou spojeny s rozdílným profilem cytokinů. Cílem studia je najít způsob, jak zabránit destrukci parodontu prostřednictvím léčby zaměřené na cytokinovou síť. Principiálně jde o použití cytokinů s ochranným účinkem, nebo inhibici destruktivních cytokinů za pomoci solubilních receptorů či protilátek.

Důkladné poznání funkcí jednotlivých cytokinů a jejich vzájemných funkčních interakcí má velký praktický význam pro fyziologické a patologické reakce organismu.

Přehled hlavních cytokinů ovlivňujících onemocnění parodontu je uveden v následující tabulce (Tab.č.2)

Tab.č.:2 Přehled cytokinů

| Cytokin                      | Zdroj  | Hlavní funkce  | Poznámka  |
|------------------------------|--|--|---|
| IL-1 $\alpha$ , $\beta$      | makrofágy, dendritické a endoteliální buňky, neutrofil                   | kostimulace T buněk, indukce TNF a IL-8, pyrogen   | U pacientů ovlivňuje produkci prostaglandinů aktivovanými makrofágy a fibroblasty (TAKADA <i>et al.</i> 1991), indukuje resorpci kosti alveolárního výběžku. IL-1 $\beta$ je hlavní mediátor resorpce alveolární kosti. |
| IL-2                         | T <sub>H</sub> 1 buňky   | růstový faktor T, NK a B buněk   | Aktivuje T <sub>H</sub> 1 lymfocyty a makrofágy k produkci prozánětlivých cytokinů. Jeho produkce se zvyšuje po aktivaci buněk LPS.   |
| IL-4                         | Tc, bazofily, mastocyty  | aktivace B buněk, indukce T <sub>H</sub> 2, přesmyk na IgE a IgG4, inhibice T <sub>H</sub> 1 a makrofágů | Stimulace nespecifických protilátek, hladina IL-4 pozitivně koreluje se zvýšeným počtem B lymfocytů v parodontálních lézích.  |
| IL-6                         | T <sub>H</sub> 2, makrofágy, neutrofil                                   | Stimulace T a B lymfocytů, stimulace proteinů akutní fáze  | Produkce fibroblasty, epidermálními a epiteliálními buňkami parodontu (YANAKAZI <i>et al.</i> 1995). Neprokázané zvýšení tvorby v sulkulární tekutině v místě zánětu (BARTOVÁ <i>et al.</i> 1995)                       |
| IL-8                         | monocyty, fibroblasty, epiteliální buňky po stimulaci IL-1, TNF nebo LPS | Chemoatrakce lymfocytů   | Indukuje expresi aktivačních molekul na povrchu PMN, v buňkách enzymy a superoxid.  |
| IL-10                        | T <sub>H</sub> 2, makrofágy, neutrofil                                   | Inhibice T <sub>H</sub> 1 cytokinů a makrofágů snižuje aktivitu APC                                      | Ovlivňuje prezentaci antigenu APC buňkám Inhibuje syntézu cytokinů cytotoxickými buňkami  |
| IL -12                       | makrofágy, NK, B   | Stimulace T <sub>H</sub> 1 a NK  | Aktivační faktor NK buněk a cytotoxických lymfocytů, které stimuluje k produkci IFN- $\gamma$   |
| IL-18                        | aktivované makrofágy,  | ko-indukce INF- $\gamma$   | V přítomnosti IL-12 stimuluje odpověď T <sub>H</sub> 1 směru, v nepřítomnosti IL-12 produkci cytokinů T <sub>H</sub> 2 (DELALEU A BICKEL 2000).   |
| INF- $\alpha$                | T <sub>H</sub> 1, fibroblasty  | Antivirové účinky, zvyšuje expresi MHC I   | Ovlivňuje růst a vývoj bakterií a navozuje produkci některých protilátek třída IgG  |
| INF- $\gamma$                | T <sub>H</sub> 1, NK buňky   | Aktivace makrofágů   | Inhibiční působení na aktivitu osteoklastů, inhibice resorpce kosti (OKADA <i>et al.</i> 1995).   |
| TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ | makrofágy, NK, T buňky   | Mediátory zánětu, aktivace endot   | Indukují expresi MHC glykoproteinů a produkci mnoha cytokinů ve vyšších koncentracích je cytotoxický  |

#### 4.5.3.1 Polymorfismus genů pro cytokiny

Geny pro cytokiny a jejich receptory se nacházejí v celém genomu. Polymorfismus genů pro cytokiny může vést k defektní nebo nadbytečné produkci určitého cytokinu, čímž dochází k narušení rovnováhy mezi  $T_H1$ ,  $T_H2$  eventuálně i mezi regulační  $T_{reg}$  subpopulací. Bylo prokázáno, že nerovnováha mezi těmito subpopulacemi hraje roli v etiologii řady onemocnění (KEEN 2002).

Mnohé studie poukazují na úzký vztah mezi polymorfismy genů a cytokiny a to zejména z těchto 2 důvodů:

- 1) cytokiny a jejich receptory jsou velmi polymorfní
- 2) cytokiny a cytokinové receptory jsou velmi konzervativní v kódovaných exonových oblastech, velký polymorfismus však nalezneme v nepřekládaných oblastech – intronech.

V souvislosti s parodontitidou byli dosud studovány následující cytokiny a jejich polymorfismy.

IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$  jsou jedny z nejdůležitějších prozánětlivých cytokinů v odpovědi na bakterie zubního povlaku, mají prozánětlivý účinek, stimulují resorpci alveolární kosti a regulují proliferaci fibroblastů (GRAVES a COCHRAN, 2003). V genu pro IL-1 byly nalezeny 2 polymorfismy, asociované s výskytem parodontitidy dospělých, jedná se o alelu IL-1 $\alpha$  v pozici - 889 (záměna nukleotidů C za T) a alelu IL-1 $\beta$  v pozici + 3953 (záměna nukleotidů C za T). Kombinace těchto dvou rizikových genů tzv. kombinovaný genotyp byl zjištěn u pacientů s parodontitidou (KORNMAN *et al.* 1997, PAKHILL *et al.* 2000, LANGA *et al.* 2000, KRÁTKÁ *et al.* 2006). Vztah mezi parodontitidou a IL-1 kombinovaným genotypem však nebyl potvrzen v řadě publikací (HODGE *et al.* 2001, ENGBRETSON *et al.* 1999, HOLLÁ *et al.* 2004). IL-1 je pouze jedním z rizikových faktorů, jehož účinek na rozvoj onemocnění se uplatní až v přítomnosti dalších rizikových faktorů jako např. přítomnost patogenních bakterií či kouření (CULLIANAN *et al.* 2001 a KRÁTKÁ *et al.* 2006).

PAGE však již v roce 1993 prokázal, že krevní monocyty pacientů s AP tvoří 2-3x více IL-1 $\beta$  a PGE<sub>2</sub> než monocyty osob, které jsou rezistentní. IL-1 $\beta$  a PGE<sub>2</sub>

aktivují ve tkáni přítomné fibroblasty k tvorbě metaloproteináz, které napomáhají destrukci extracelulární matrix.

U genu pro IL-6 sledovaného z důvodu genových polymorfismů, byla také prokázána souvislost s rozvojem parodontitidy (HOLLÁ *et al.* 2004). Byla zjištěna signifikantně nižší heterozygotní kombinace G/C v pozici -572 v promotoru genu pro IL-6 u pacientů s chronickou parodontitidou než u zdravých osob. HOLLÁ *et al.* (2002) dále sledovali polymorfismus v promotoru genu pro CD14. V tomto místě se vyskytuje polymorfismus ve dvou lokalitách C (- 159) T a G (- 1359) T. Bylo zjištěno, že u pacientů s rozvinutou parodontitidou dospělých se signifikantně častěji objevuje pozici G (- 1359) T než u pacientů s mírnou parodontitidou dospělých. Homozygotní genotyp GG byl signifikantně častěji detekován u pacientů s rozvinutou parodontitidou než u pacientů s mírnou parodontitidou.

I u genu pro IL-10 byl testován vztah mezi parodontitidou a polymorfismem genů (KINANE *et al.* 1999) a dále pak pro tumor necrosis factor TNF- $\beta$  (MUNDY 1993, KINANE *et al.* 1999), Fc -  $\gamma$  receptory (KOBAYASHI *et al.* 1997), transforming growth factor TGF- $\beta$  (HOLLÁ *et al.* 2002), toll-like receptor TLR-2 (BOCHUND *et al.* 2003), TLR-4 (ARBOUR *et al.* 2000), receptor pro vitamín D (INAGAKI *et al.* 2003), matrixovou metaloproteinázu (MMP)-1 (IZAKOVIČOVÁ – HOLLÁ *et al.* 2004). V žádné z těchto zmiňovaných studií nebyla zjištěna průkazná závislost mezi genovým polymorfismem a parodontitidou.

Polymorfismy genů pro cytokiny a jejich receptory se zdají být důležitými kandidátními genetickými faktory pro rozvoj imunopatologických reakcí a jsou spojovány se sklonem ke vzniku řady autoimunitních chorob.

# **MATERIÁL A METODIKA**

## **1. CHARAKTERISTIKA PACIENTŮ**

## **2. POUŽITÉ ROZTOKY A CHEMIKÁLIE**

## **3. METODY**

- Izolace mononukleárních buněk z periferní krve pomocí Ficol – Paque gradientu
- Stimulace lymfocytů k tvorbě cytokinů
- Multiplexová analýza – Metoda LUMINEX
- Genetická vyšetření polymorfismu genů pro cytokiny

## **5. MATERIÁL A METODIKA**

### **5.1. CHARAKTERISTIKA PACIENTŮ**

V souhlasu s Helsinskými dohodami byl od všech vyšetřovaných osob získán písemný souhlas s odběrem materiálu k imunologickému a genetickému vyšetření (viz. text níže).

K vyšetření bylo vybráno 15 pacientů ze souboru 250 pacientů s diagnózou chronické parodontitidy ve věku 35 -56 let, navštěvující dlouhodobě Stomatologickou kliniku FN u sv. Anny a Ústav parodontologie MU v Brně. Podmínkou zařazení do studie je přítomnost parodontálních chobotů hlubokých min. 3,5 mm ve dvou sextantech chrupu a resorpce alveolární kosti.

Odběr žilní krve (30 ml) byl prováděn v Brně pod vedením prof. MUDr. Lydie Izakovičové – Hollé, PhD.

## **INFORMOVANÝ SOUHLAS PACIENTA S VYŠETŘENÍM**

**JMÉNO A PŘIJMENÍ PACIENTA:**

**DATUM NAROZENÍ:**

**ADRESA:**

Souhlasím se zařazením své osoby do vyšetřovaného souboru výzkumného projektu: Analýza polymorfismu v genech prozánětlivých a remodelačních faktorů ve vztahu k imunitní reakci a klinickému stavu pacienta s parodontitidou.

Cílem projektu je studium genetických rozdílů, které mohou být příčinou změněné imunitní reakce pacientů s parodontitidou.

Při vyšetření budou použity následující vyšetřovací metody v parodontologické ordinaci bude vyšetřen parodontologem stav Vašeho chrupu a doporučené případné další léčení. Současně Vám bude odebráno 30 ml srážlivé krve na imunologické vyšetření + 10 ml nesrážlivé krve na genetické vyšetření, kterými stanovíme v testech riziko dalšího rozvoje parodontitidy. Účelem těchto vyšetření je odebrat, uchovat a použít k vyšetření rizikových faktorů parodontitidy vzorek Vaší krve.

Váš souhlas s vyšetřením a dalším nakládáním se vzorkem krve je dobrovolný a můžete jej kdykoliv zrušit a to i bez uvedení důvodu. Pro zachování Vaší anonymity budou vzorky krve uchovány pod číselným kódem. Přístup k číselnému kódu a tudíž identifikaci vzorku s Vámi má pouze vedoucí lékař výzkumu. Vzorek krve bude uchován o dobu 3 měsíců. Po tuto dobu budou prováděna potřebná vyšetření. Poté budou veškeré vzorky krve zlikvidovány.

Se vzorkem Vaší krve bude po celou dobu uchování zacházeno jako s nosičem osobních údajů. Získané údaje budou sloužit pouze pro účely řešení výše uvedeného projektu a proto informaci řešitelů projektu. Získané údaje mohou být využity k dalšímu statistickému zpracování a vědeckému zkoumání. V tomto případě budou výsledky zbaveny jakýchkoliv identifikačních údajů a nebu tedy možné nalést spojitost mezi uvedenými výsledky a Vaší osobou. Potvrzuji tímto, že jsem přečetl/la a pochopil/la informace pro pacienta týkající se uvedeného vyšetření a že jsem měl/a příležitost vznést své dotazy. Svým podpisem stvrzuji, že s vyšetřením souhlasím.

V Brně.....Podpis pacienta.....



## 5.2. POUŽITÉ ROZTOKY A CHEMIKÁLIE

### 5.2.1. Roztoky používané ve většině testů

**TK voda (TK H<sub>2</sub>O)** - deionizovaná voda pro tkáňové kultury, ÚMG AV Praha

**Fosfát - fyziologický roztok (PBS):** 45g NaCl, 6g Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O a 0,5g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O rozpustit v 5l destilované vody, pH roztoku= 7,2 - 7,4

**Fosfát - fyziologický roztok s Tweenem (PBS+Tween ):** do 0,5l PBS přidat 0,5ml Tweenu (Tween 20, Serva)

**Hanksův pufr bez hořečnatých a vápenatých iontů (HBSS)** -ÚMG ČÚV Praha, pH = 7,2 - 7,4

**X – Vivo médium** (Bio Whittaket <sup>TM</sup>)

**Kultivační X – Vivo médium** – do 100ml X-Vivo 10 média přidat 1ml roztoku L-glutaminu (Sevac, 25mg/ml)

**Ficoll – Paque (Amersham Biosciences)** používá se neředěný o hustotě 1,077g/ml

**Türkův roztok-** používá se ředěný 1:5 s vodou

### 5.2.2. Stimulace buněk - aktivátory lymfocytů k produkci cytokinů

#### 1) Polyklonální aktivátory

**pokeweed mitogen** –PWM (Sigma), polyklonální aktivátor, slouží jako pozitivní kontrola, ředěn v X-vivo médiu na koncentraci 20μg/ml

**Concanavalin A - ConA** (Sigma), polyklonální aktivátor, ředěn v X-vivo médiu na koncentraci 100μg/ml

#### 2) Bakteriální antigeny

***Actinobacillus actinomycetemcomitans* (CCM 6053 – A.a.)** – byl izolován ze subgingivální lokality u pacientů s parodontitidou, suspenze bakterií o koncentraci 10<sup>9</sup> buněk/ml byla inaktivována inkubací 20min při 120°C. Vzorek byl centrifugován 10min při 600g. Sediment byl naředěn v PBS a centrifugován 10min při 600g. a následně 3krát promyt. Po promytí byl sediment naředěn X-vivo médiem tak, aby optická denzita odpovídala koncentraci 10<sup>9</sup> buněk / ml.

***Porphyromonas gingivalis* (P.g.)** – bakterie byly připraveny obdobně jako *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

*Escherichia coli* (*E.coli*) – standardní kmen O86 byl poskytnut prof. MUDr. H. Tlaskalovou, DrSc. MBÚ ČAV, Praha. Kultura bakterií byla teplotně inaktivována a naředěná v X-vivo médiu na koncentraci 10<sup>9</sup> buněk/ml.

*Tannerella forsythensis* (*T.f.*) – standardní kmen ze sbírky ATCC (identifikační číslo 43037). Kulturu ředíme na koncentraci 10<sup>9</sup> buněk/ml.

### 3) Proteiny tepelného šoku (HSP)

HSP 60 (Stress Gen)

## 5.2.3. Chemikálie a reagenty použité v metodě LUMINEX

**Promývací roztok (wash buffer)** - připraven z 20 ml promývacího roztoku a 480 ml destil.vody

**Kalibrační roztok RD5K (calibrator diluent)** – připraven z 20 ml koncentrátu kalibračního roztoku a 20 ml destil. vody

**Standarda** – rekonstituovali jsme Standard Cocktail 1 a 2 v Calibrator diluentu RD5K (1krát) dle přiložených karet (viz.Tab.č.4), poté za občasného promíchání nechatli 15 minut stát.

### Tab. č. 3: Flurokine® MAP Standard Values

Part # 895546

Lot # 2382223

Reconstitution Volume: 1.0 ml

| Analyt        | Conc.(pg/mL) | Analyt        | Conc.(pg/mL) |
|---------------|--------------|---------------|--------------|
| IL-1 $\alpha$ | 2,400        | IL-8          | 3,600        |
| IL-5          | 1,300        | IL-10         | 3,800        |
| INF $\gamma$  | 1,900        | TNF- $\alpha$ | 2,800        |
| IL-1 $\beta$  | 1,600        | IL-6          | 3,500        |
| IL-4          | 2,400        |               |              |

**Příprava standardů pro kalibrační křivku:** připravili jsem si 8 polypropylenových zkumavek, označených S0- S7, S0 nulový standard (blank), S1 (nejvyšší standard). Do S1 jsme napipetovali 300 µl Calibrator Diluentu a do ostatních (S2 – S7) po 200 µl, poté jsme pipetovali do S1 100 µl z každého Standard cocktailu a následně jsme přenášeli vždy 100 µl ze zkumavky S1 až do S7. Před každým přenesením jsme každou zkumavku řádně promíchali.

**Mikropartikule** (Microparticle Concentrate) – přípravě mikropartikuli ještě před odstraněním víčka předcházela centrifugace 30 sekund při 1000krat g, následně jsme jemně Microparticle Concentrate zvortexovali a naředili mikropartikule v mixační lahvičce dle počtu vzorku (viz.Tab.č.4)

**Tab. č. 4: Příprava mikropartikulí**

| Počet jamek | Microparticle concentrate | Microparticle diluent |
|-------------|---------------------------|-----------------------|
| 96          | 50 µL                     | 5,0 mL                |
| 72          | 37,5 µL                   | 3,75 mL               |
| 48          | 25 µL                     | 2,5 mL                |
| 24          | 12,5 µL                   | 1,25 mL               |

**Biotin – Antibody Coctail** – před odstraněním víčka jsme každý Biotin Antibody centrifugovali 30 sekund při 1000krát g, následně jsme je jemně zvortexovali a přidali 50 µl každé Biotin antibody do Biotin Antibody diluentu a jemně promíchali.

**Streptavidin – PE** (streptavidin-phycoerythrin)- před odstraněním víčka jsme Streptavidin-PE centrifugovali 30 sekund při 1000krát g, následně jsme jej jemně zvortexovali a naředili (100krát Streptavidin-PE na 1krát koncentrovaný přidáním 55 µl streptavidinu –PE do 5,5 ml promývacího roztoku). Roztok Streptavidinu- PE musí být po celou dobu chráněn před světlem.

#### **5.2.4. Chemikálie a roztoky používané při izolaci DNA a následné amplifikaci**

##### **Izolace DNA:**

0,5 ml EDTA (pH 0,8) – etylendiamintetraoctová kyselina

3 ml FASANA roztoku ( roztok s 5M – NaCl, 0,5M – EDTA, 1M – TRIS, 10% sodium dodecylsulfát)

20 µl proteinkinázy K (Sigma)

1,4 ml 5M – NaCl (Chemapol)

1,4 ml chloroformu (Chemapol)

4 ml isopropanolu (Chemapol)

70% ethanolu

250 µl TE pufru (10 mM TRIS – HCl pH = 8, 1 mM EDTA)

##### **Amplifikace DNA – (PCR):**

200 µmol/l dNTP

1,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub> (Chemapol)

10 mmol/l Tris base ( pH 8,4)

50 mmol/l KCl (Chemapol)

0,15 U Taq polymerázy

##### **Elektorforésa:**

**2 % agarosový gel** – gel se připravuje rozvařením práškové agarósy

v elektroforetickém pufru, 2% agarósa (Agarose Serva) v 1x TAE pufru (0,04 M Tris – kyselina octová, 0,001 M EDTA)

**Zásobní elektroforetický pufr** : 10x TAE (0,4 M Tris – kyselina octová, 0,01 M EDTA)

**Etidium bromid (EtBr)** – pro vizualizaci elektroforetického gelu, využívá se vlastnosti fluorescenční molekuly EtBr interkalovat do vlákna nukleových kyselin

### 5.3. METODY

1. Separace mononukleárních buněk z periferní krve pomocí Ficoll – Paque gradientu
2. Stimulace lymfocytů k produkci cytokinů
3. Stanovení tvorby cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  metodou multiplexové analýzy LUMINEX použitím standartních kitů R&D Systems, Flurokine<sup>®</sup> MAP, Human MultiAnalyte Profiling Human Base Kit A
4. Genetiká vyšetření polymorfismu genů pro cytokiny použitím metody PCR

#### **1. Separace mononukleárních buněk z periferní krve pomocí Ficoll – Paque gradientu**

Mononukleární buňky byly izolovány z periferní krve metodou izolace na gradientu roztoku Ficoll-Paque popsané BOYUMEM (1968) a TLASKALOVOU *et al.* (1985). Práce probíhá za sterilních podmínek ve sterilním boxu.

1. K imunologickému vyšetření bylo pacientům odebráno 30 ml periferní srážlivé krve do 3 zkumavek Vaccuette s heparinem.

2. Periferní krev naředíme v pomětu 1:1 médium X-vivo a opatrně ji převrstvíme na 3ml roztoku Ficoll-Paque v 15ml zkumavkách.

3. Následuje centrifugace 30 min. při 600g. Při centrifugaci dochází k rozvrstvení krve na základě hustotního gradientu (Obr. č.7)

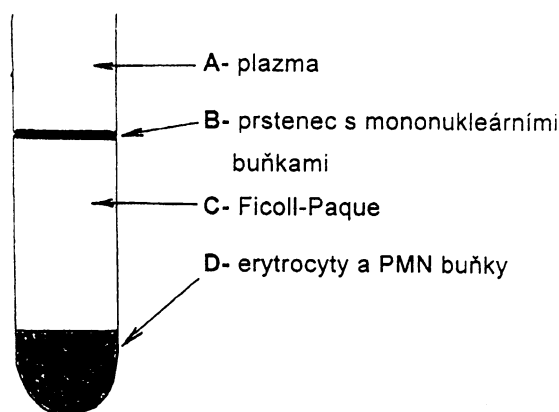
A) Vrstva A obsahuje krevní plazmu, kterou odsajeme. Z plazmou již dále nepracujeme.

B) Vrstvu B tvoří mléčně bílý prstenec mononukleárních buněk, tuto vrstvu pečlivě odsajeme a přeneseme do sterilních umělohmotných zkumavek o objemu 50 ml.

C) Vrstvu C tvoří Ficoll-Paque.

D) Vrstva D obsahuje sedimentované polymorfonukleární buňky a erythrocyty.

**Obr.č. 6: Izolace mononukleárních buněk pomocí gradientové centrifugace**



#### **Zpracování buněk po separaci:**

4. K mononukleárním buňkám (v 50 ml umělohmotných zkumavkách) jsme přidali X- Vivo médium a následně centrifugovali 10 min při 400g.

5. Supernatant jsme slili, peletu s buňkami na dně zkumavky jsme rozklepali, doplnili X- Vivo médiem do 50 ml a opět centrifugovali 10 min. při 200g.

6. Na počítání buněk jsme odpipetovali 50 $\mu$ l ze suspenze buněk a převedli do mikrozkušavky (eppendorfky) s 950  $\mu$ l Türkova roztoku a řádně promýchali.

7. Koncentraci lymfocytů jsme stanovili spočítáním v Bürgerově komůrce. Počítali jsem v 50 čtvercích pomocí pravidla L.

8. Buňky jsme naředili na koncentraci 10<sup>7</sup> buněk/ml kultivačním X – Vivo médiem.

## 2. Stimulace lymfocytů k tvorbě cytokinů

Mononukleární buňky separované z periferní krve ( $10^7$  buněk/ml) byly stimulovány s mitogeny a bakteriemi při 37°C a 5% CO<sub>2</sub> v atmosféře.

### Dané aktivátory jsme použili z těchto důvodů:

PWM – pokeweed mitogen, látka izolovaná z *Phytolacca americana*, polyklonálně aktivuje T a B lymfocyty

Con A – concavalin A, látka izolovaná z *Canavalia ensiformis*, mitogen aktivující T lymfocyty

Při současném použití PWM + ConA dochází k poklesu polyklonální tvorby imunoglobulinů (BÁRTOVÁ *et al.* 1998) nejspíš vlivem aktivace regulačních T-lymfocytů

*Actionobacillus actinomycetemcomitans* – gramnegativní bakterie, suspektní patogen juvenilní parodontitidy. Nachází se v subgingiválním plaku pacientů. Imunitní reakci ovlivňují zejména lipopolysacharidy (LPS) obsažené v buněčné stěně bakterií, které polyklonálně aktivují B-lymfocyty

*E.coli* – v předchozích studiích bylo zjištěno, že buňky pacientů s onemocněním parodontu reagují zvýšenou tvorbou na stimulaci v porovnání s buňkami zdravých osob (BÁRTOVÁ *et al.* 1989). Jedním z možných vysvětlení této aktivace je vysoká homogenita HSP *E.coli* s HSP *Acitonobacillus actinomycetemcomitans*.

*Porphyromonas gingivalis* – gramnegativní anaerobní bakterie, objevena u chronické parodontitidy, identifikována jako jeden z hlavních parodontálních patogenů (KATZ *et al.* 1999).

*Tannerella forsythensis* – gramnegativní anaerobní bakterie, jeden z patogenů identifikovaných v parodontálním chobotu.

1. Do sterilních umělohmotných zkumavek o objemu 10 ml postupně pipetujeme:

A) 100 µl suspenze buněk

B) 100 µl naředěných mitogenů (PWM, ConA, PWM + ConA), 100 ml suspenze bakterií (*E.coli*, *Acitonobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*) a šokové proteiny HSP 60 a následně doplníme kultivačním X-Vivo médiem. V nestimulované kontrole ke

100 µl suspenze buněk přidáme pouze 900 µl kultivačního media X-Vivo. Schéma nasazení je uvedeno v tabulce č.5.

2. Buňky kultivujeme při 37° C a 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Po uplynutí doby stanovené ke stimulaci (3,6 dnů) buňky centrifugujeme 7 min. při 270g a supernatant uchováme při – 20° C ke stanovení cytokinů metodou LUMINEX.

**Tab. č.5: Schéma in vitro stimulace mononukleárních buněk**

|                 | <b>Buňky (10<sup>7</sup><br/>b/ml)</b> | <b>Stimulace</b>  | <b>Kultivační X-Vivo<br/>médium</b> |
|-----------------|--|---|-------------------------------------|
| <b>PWM</b>      | 100 µl                                 | 100µl PWM (konc.20 ug/ml)                                 | 800 µl                              |
| <b>ConA</b>     | 100 µl                                 | 100µl ConA (konc.100 µg/ml)                               | 800 µl                              |
| <b>PWM+ConA</b> | 100 µl                                 | 100µl PWM (konc.20 ug/ml)+<br>100µl ConA (konc.100 µg/ml) | 700 µl                              |
| <b>E.coli</b>   | 100 µl                                 | 100µl E.coli (konc.10 <sup>9</sup> b./ml)                 | 800 µl                              |
| <b>A.a.</b>     | 100 µl                                 | 100µl A.a. (konc.10 <sup>9</sup> b./ml)                   | 800 µl                              |
| <b>P.g.</b>     | 100 µl                                 | 100µl P.g. (konc.10 <sup>9</sup> b./ml)                   | 800 µl                              |
| <b>T.f.</b>     | 100 µl                                 | 100µl T.f. (konc.10 <sup>9</sup> b./ml)                   | 800 µl                              |
| <b>nestim.</b>  | 100 µl                                 |   | 900 µl                              |



### **3. Stanovení tvorby cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ metodou multiplexové analýzy LUMINEX použitím standartních kitů Human MultiAnalyte Profiling Human Base Kit A (R&D Systems Flurokine<sup>®</sup>MAP)**

#### **Metoda LUMINEX**

Multiplexová analýza MAP<sup>™</sup> představuje jednu z nejnovějších imunoanalytických metod. Používá se k rychlému a přesnému stanovení koncentrace velkého počtu cytokinů (max. 96 vzorků) v malém množství vzorku tekutiny (50  $\mu$ l) - supernatantu, plazmě nebo séru.

V naší studii byla sledována koncentrace cytokinů v supernatantech získaných po 3, 6 denní kultivaci mononukleárních buněk s PWM, PWM +ConA, ConA, bakteriemi *E.coli*, *Acitonobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, šokovým proteinem HSP60 a v nestimulované kultuře u 15 pacientů. Měřili jsme vždy 2 koncentrace každého vzorku 150 $\mu$ l a 50 $\mu$ l

Byla použita souprava Flurokine<sup>®</sup> MAP, Human MultiAnalyte Profiling Human Base Kit A (R&D Systems Flurokine<sup>®</sup>MAP), pomocí které byly detekovány koncentrace cytokinů: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ .. Práce byla prováděna v HLA laboratoři IKEM, Praha.

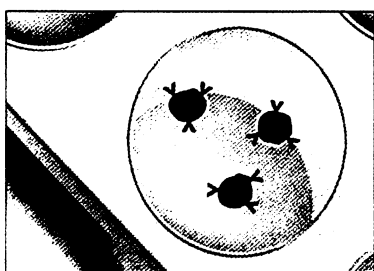
#### **Princip metody:**




Metoda využívá principu průtokové cytometrie (Obr.č.7). Je založena na kvantitativní multiplexové analýze pomocí značených mikropartikulí. Každá mikropartikule je barevně označena použitím specifických poměrů 2 fluorescenčních barev. Na každé mikropartikuli je navázána primární specifická protilátka proti danému cytokinu. Po přidání supernatantů k mikropartikulím, následuje inkubace, promytí a přidání biotinylované sekundární specifické protilátky vůči cytokinu. Opět inkubujeme, promyjeme, přidáme konjugát obsahující streptavidin-PE inkubujeme a analyzujeme na přístroji LUMINEX analyser za pomoci 2 laserů. Jeden laser je specifický pro mikropartikule a určuje, který analyt bude detekován. Druhý laser udává rozsah sekundárního phycoerythrinového signálu, který je v přímém poměru k množství analytu.

**Obr.č.7: Grafické znázornění principu metody LUMINEX pro cytokiny IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 (převzato z materiálů dodaných firmou Biomedica)**

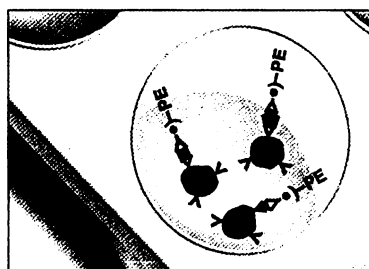
# Fluorokine MAP Multiplex Kits


IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-10 from the Fluorokine MAP Human Panel A are used as examples. The assay is not limited to 3 analytes.



-  IL-1 $\beta$  specific microparticle
-  IL-10 specific microparticle
-  IL-6 specific microparticle




**STEP 1.** Add the diluted microparticle mixture to each well of a filter-bottom microplate.



-  Streptavidin-conjugated phycoerythrin

**STEP 4.** Add the diluted Streptavidin-PE to all wells. Incubate on shaker for 30 minutes at room temperature. Wash microplate wells, removing liquid with a vacuum manifold.



-  IL-1 $\beta$
-  IL-10
-  IL-6




**STEP 2.** Add the Standard Cocktail or sample to wells. Incubate on a shaker for 2-3 hours (depending on the kit) at room temperature. Wash microplate wells, removing liquid with a vacuum manifold.



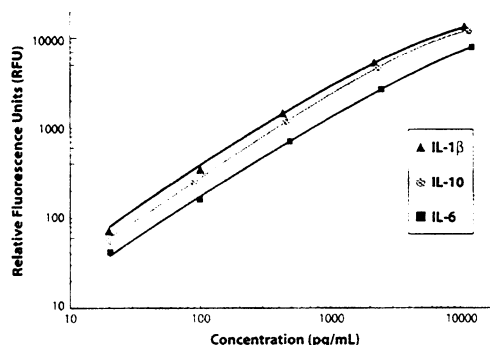
One laser is bead-specific and determines which analyte is being detected. A second laser is PE-specific and determines how much analyte is bound.

**STEP 5.** Resuspend microparticles and load plate on the Luminex 100 for analysis.



-  IL-1 $\beta$  specific biotinylated detection antibody
-  IL-10 specific biotinylated detection antibody
-  IL-6 specific biotinylated detection antibody

**STEP 3.** Add the diluted biotinylated detection antibody mixture to each well. Incubate on shaker for 1 hour at room temperature. Wash microplate wells, removing liquid with a vacuum manifold.



**STEP 6.** Recover data. Typical standard curves for IL-1 $\beta$ , IL-10, and IL-6 run simultaneously.



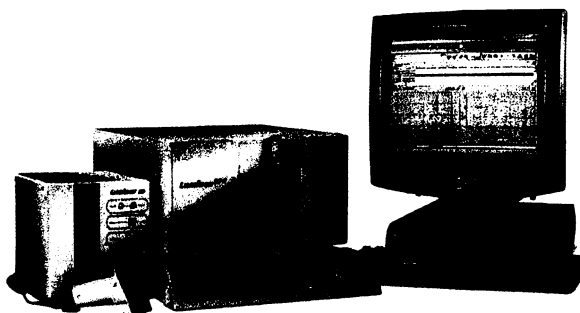
## **Postup:**

Postup byl prováděn dle návodu v soupravě.

- 1) Prvním krokem je příprava všech reagensí, standardů a vzorků
- 2) Dále navlhčíme membránu destičky promývacím roztokem (100  $\mu$ l do každé jamky) a následně odsajeme vakuovou pumpou
- 3) Resuspendujeme naředěné mikropartikule (zvortexováním, převrácením)
- 4) Přidáme 50  $\mu$ l mikropartikulí do každé jamky
- 5) Během 15 min napipetujeme 50  $\mu$ l standardu a vzorky
- 6) Překryjeme destičkou folií a inkubujeme při laboratorní teplotě 3 hodiny na horizontálním orbitálním shakeru při 500 rpm
- 7) Po inkubaci odsájeme tekutinu za pomoci vakuové pumpy, promyjeme destičku 3krát 100  $\mu$ l promývacího roztoku/jamku.
- 8) Do každé jamky přidáme 50  $\mu$ l připraveného biotin - antibody cocktailu, překryjeme destičku folií a následně inkubujeme 1 hodinu na shakeru.
- 9) Opět promyjeme, 3krát 100  $\mu$ l promývacího roztoku/jamku.
- 10) Do každé jamky přidáme 50  $\mu$ l připraveného streptavidinu -PE, překryjeme folií a inkubujeme 30 min na shakeru.
- 11) Promyjeme, 3krát 100  $\mu$ l promývacího roztoku/jamku.
- 12) Na závěr resuspendujeme mikropartikule ve 100  $\mu$ l promývacího roztoku, necháme inkubovat 2 min. na shakeru a do 90 min analyzujeme přístrojem LUMINEX® 100TM analyzer.

## Vlastní měření na přístroji LUMINEX® 100TM analyzeru

Samotnému měření předchází vždy promytí přístroje, zahřátí laseru (30 min) a vytvoření protokolu – naprogramování programu Luminex 100 IS Software.



Obr.č.8: LUMINEX® 100TM analyzer

Námi vytvořený protokol musí obsahovat informace o standardu, počtu cytokinů, které budeme měřit a v jakých oblastech se dané cytokiny nachází a v jaké jsou koncentraci (Tab.č.6). Destičku vložíme do přístroje.

Tab.č.6: Protokol

| standarda            | koncentrace |      |          |      |      |      |      |       |          |
|----------------------|-------------|------|----------|------|------|------|------|-------|----------|
|                      | IL-1        | IL-5 | IFN-gama | IL-1 | IL-4 | IL-6 | IL-8 | IL-10 | TNF-alfa |
| S0                   | 0           | 0    | 0        | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0        |
| S7                   | 3,3         | 1,8  | 2,6      | 2,2  | 3,3  | 4,8  | 4,9  | 3,6   | 3,8      |
| S6                   | 9,9         | 5,4  | 7,8      | 6,6  | 9,9  | 14,4 | 14,8 | 10,7  | 11,5     |
| S5                   | 29,7        | 16   | 23,5     | 19,8 | 29,7 | 43   | 44   | 32    | 35       |
| S4                   | 89          | 48   | 70       | 59   | 89   | 130  | 133  | 96    | 104      |
| S3                   | 267         | 144  | 211      | 178  | 267  | 389  | 400  | 289   | 311      |
| S2                   | 800         | 433  | 633      | 533  | 800  | 1167 | 1200 | 867   | 933      |
| S1                   | 2400        | 1300 | 1900     | 1600 | 2400 | 3500 | 3600 | 2600  | 2800     |
| microparticle region | 5           | 9    | 75       | 6    | 21   | 32   | 36   | 50    | 77       |

Měření každé jamky trvá max 94 sekund, za tuto dobu dochází k vychytávání značených mikroparticulí s navázanými cytokiny a jejich analýze.

Po ukončení každého měření přístroj promyjeme.

#### 4. Genetická vyšetření polymorfismu genů pro cytokiny

Tato část práce byla provedena v Brně v Ústavu patofyziologie MU pod vedením prof. MUDr. Lydie Izakovičové–Hollé, Phd. V naší práci jsme již pracovali s detekovanými polymorfismy.

##### **Izolace DNA a amplifikace DNA pomocí PCR - RFLP**

Genomická DNA byla izolována z periferní žilní krve standardní technikou pomocí proteinkinázy K (SAMBROOK *et al.* 1989)

1. Ke genetickému vyšetření bylo pacientům odebráno 5 ml periferní žilní krve.
2. Krev byla ihned po odběru smíchána s 300  $\mu$ l 0,5 ml EDTA (pH 0,8, slouží jako antikoagulační činidlo).
3. Následovala centrifugace 10 min. při 3000 otáčkách za minutu a lýze erytrocytů
4. Lýza erytrocytů – k erytrocytům přidáme destilovanou vodu do celkového objemu 20 ml, zamrazíme na teplotu -20 minimálně po dobu 48 hod.
5. Po rozmražení (ve vlažné vodě, přibližně za 20 min.) centrifugujeme 2x 10 min. při 5000 otáčkách za minutu při 4°C. Mezi jednotlivými centrifugacemi peletu na dně zkumavky promyjeme 20 ml fyziologického roztoku.
6. K promyté peletě přidáme 0,5 ml chladného fyziologického roztoku, 3 ml FASANA roztoku (roztok s 5M- NaCl, 0,5M-EDTA, 1M – TRIS, 10% sodium dodecylsulfátem) a 20  $\mu$ l proteinkinázy K.
7. Důkladně promícháme a inkubujeme do příštího dne při 37°C.
8. Následující den k lyzátu přidáme 1,4 ml 5M – NaCl a 1,4 ml chloroformu a centrifugujeme 15 min. při 8000 otáčkách za minutu při 4°C.
9. Volnou fázi obsahující DNA přeneseme do čisté zkumavky.
10. DNA vysrážíme za mírného míchání přidáním 4 ml ledového isopropanolu.
11. Vysrážená vlákna DNA namotáme na vyžíhaný skleněný háček, opláchneme 70% ethanolem a osušíme 10 min. na vzduchu.
12. Následně DNA řádně rozpustíme během 24 hod. při pokojové teplotě za občasného míchání ve 250  $\mu$ l TE – pufru.
13. Pro následné použití DNA uchováme v -20°C (dlouhodobě až při -70°C).

14. Genotypy polymorfismů vybraných genů byly detekovány pomocí polymerázové řetězové reakce - PCR na kterou navazovala restrikční analýza. Restrikční analýza od sebe umožní rozlišit jednotlivé alely, které se liší v důsledku místně specifického štěpení dané varianty délkou a lze je následně prokázat na horizontální elektroforéze.

15. Pro naší práci byly detekovány genotypy polymorfismů v genech pro IL-1 $\alpha$  (C/T v pozici -889), IL-1 $\beta$  (C/T v pozici + 3953), IL-4 (C/T v pozici -589, C/T v pozici

-33, intron 3 1-254, 2-184), IL-6 (G/C v pozici -174, G/A v pozici - 597, G/C v pozici -572) a TNF -  $\alpha$ . (G/A v pozici -308).

# **VÝSLEDKY**

- 1. ZAVEDENÍ METODY LUMINEX**
- 2. VÝSLEDKY PRODUKCE CYTOKINŮ  
MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK PO STIMULACI  
MITOGENY A BAKTERIEMI MĚŘENÁ METODOU  
LUMINEX**
- 3. VÝSLEDKY GENETICKÝCH VYŠETŘENÍ  
POLYMORFISMŮ GENŮ PRO CYTOKINY**
- 4. VÝSLEDKY VZÁJEMNÉ KORELACE PRODUKCE  
CYTOKINŮ K POLYMORFISMU GENŮ PRO  
CYTOKINY**

## 6. VÝSLEDKY

### 6.1. ZAVEDENÍ METODY LUMINEX

Seznámení se s metodou LUMINEX a její zavedení bylo jedním z cílů diplomové práce. Metoda LUMINEX nám umožňuje kvantitativní multiplexovou analýzu cytokinů pomocí značených mikropartikulí.

LUMINEX nám přináší značné urychlení naší práce. Měření probíhá v průběhu 1 dne a za tuto dobu můžeme analyzovat nejméně 96 vzorků. Velkým přínosem je i velmi malé množství vzorku nutné k analýze – 50  $\mu$ l a snadná reprodukovatelnost naměřených výsledků. Výsledky jsou udávány v pg/ml.

Metodická úskalí nám může způsobit nedostatečné odsátí destičky, nepečlivá práce s mikropartikulemi, nastavení přístroje LUMINEX® 100TM analyzer, nastavení jehly, která nasává vzorky. V neposlední řadě musíme také dbát na to, aby nedocházelo k přehřátí přístroje. Nevýhodou může být i finanční nákladnost metody.

I přes všechna námi popsaná metodická úskalí je použití metody LUMINEX velmi výhodné a má budoucnost v klinické praxi.

### 6.2. PRODUKCE CYTOKINŮ MONONUKLEÁRNÍMI BUŇKAMI PO STIMULACI MITOGENY A BAKTERIEMI MĚŘENÁ METODOU MULTIPLEXOVÉ ANALÝZY – METODOU LUMINEX.

Ve své diplomové práci jsem sledovala produkci cytokinů IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN –  $\gamma$ , TNF -  $\alpha$  po stimulaci mononukleárních buněk (izolovaných z periferní krve pacientů) mitogeny PWM, PWM + ConA, bakteriemi *E.coli*, *Acitonobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* a šokovým proteinem HSP 60.

Z periferní krve 15 pacientů jsme izolovali mononukleární buňky (kap.5.3.1). Buňky jsme kultivovali s mitogeny a bakteriemi 3 a 6 dní. (kap.5.3.2.) a následně za pomoci multiplexové analýzy – metody LUMINEX měřili koncentraci daných cytokinů.



## 6.2.1. Výsledky analytického zpracování dat měření

Luminex kvantifikuje integrální intenzitu fluorescence ve vzorku. Samotná analýza a zpracování dat bylo provedeno za pomoci programu Luminex 100 IS Software.

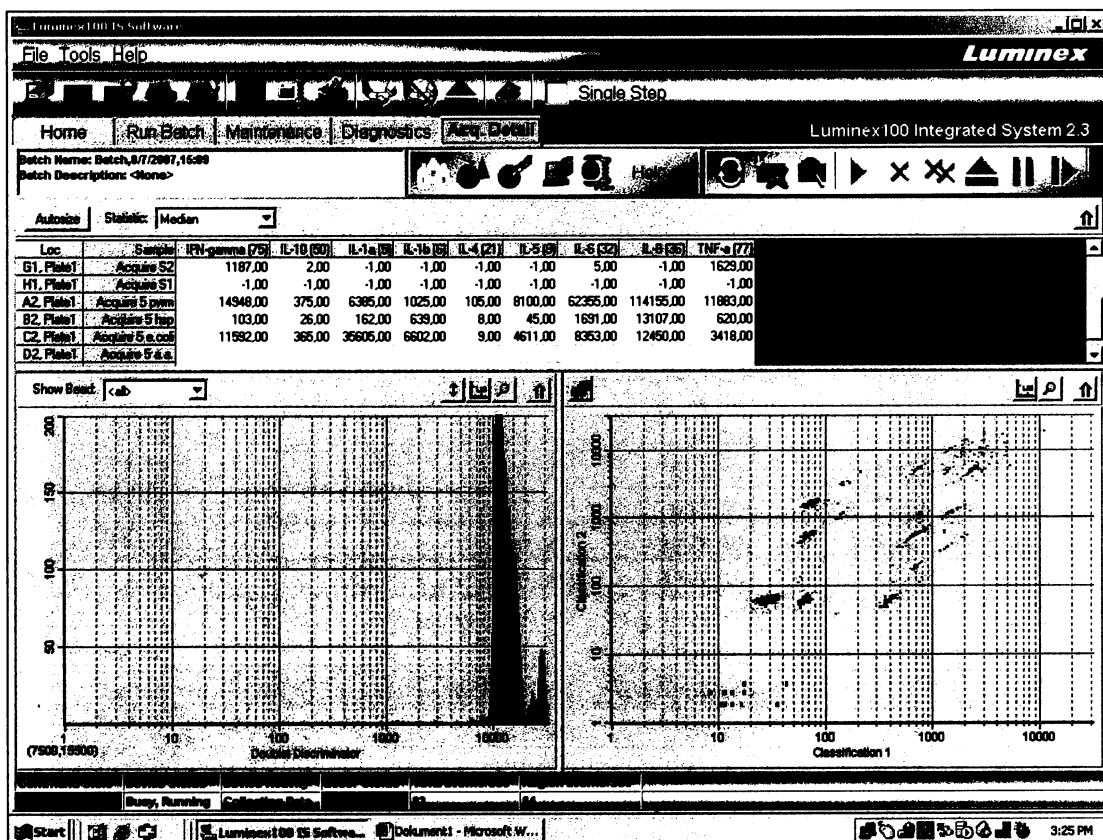
Na obrázku č.9 můžeme vidět grafické znázornění v průběhu samotného měření.

Soubor obrázků č.10 znázorňuje samotné výsledky po analýze v programu Luminex 100 IS Software pro IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . jsou znázorněny pouze kalibrační křivky a část vzorečků.

Tvorba cytokinů po stimulaci byla porovnávána s nestimulovanou reakcí a hodnocena stimulačním indexem (SI). SI = stimulovaná kultura/nestimulovaná kultura

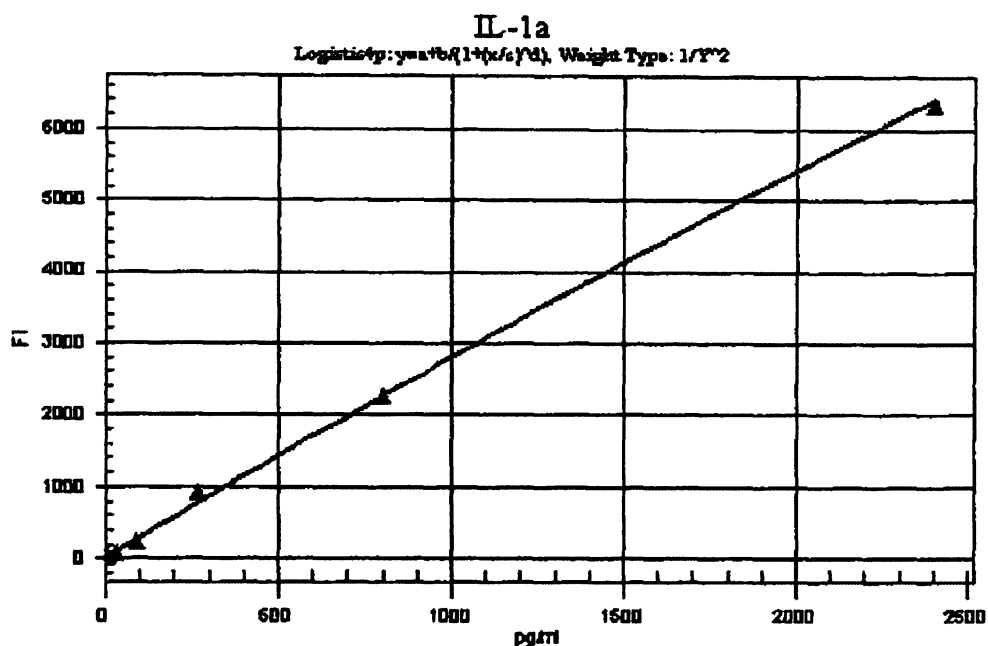
Celkový přehled všech naměřených hodnot a stimulačních indexů je souhrně a přehledně uveden v příloze č. 1. na konci práce (Příloha č.1: Výsledky měření z přístroje LUMINEX + stimulační indexy – 15 pacientů, odběry z 18.5.2006).

Obr.9: Grafické znázornění měření v programu LUMINEX 100 IS Software



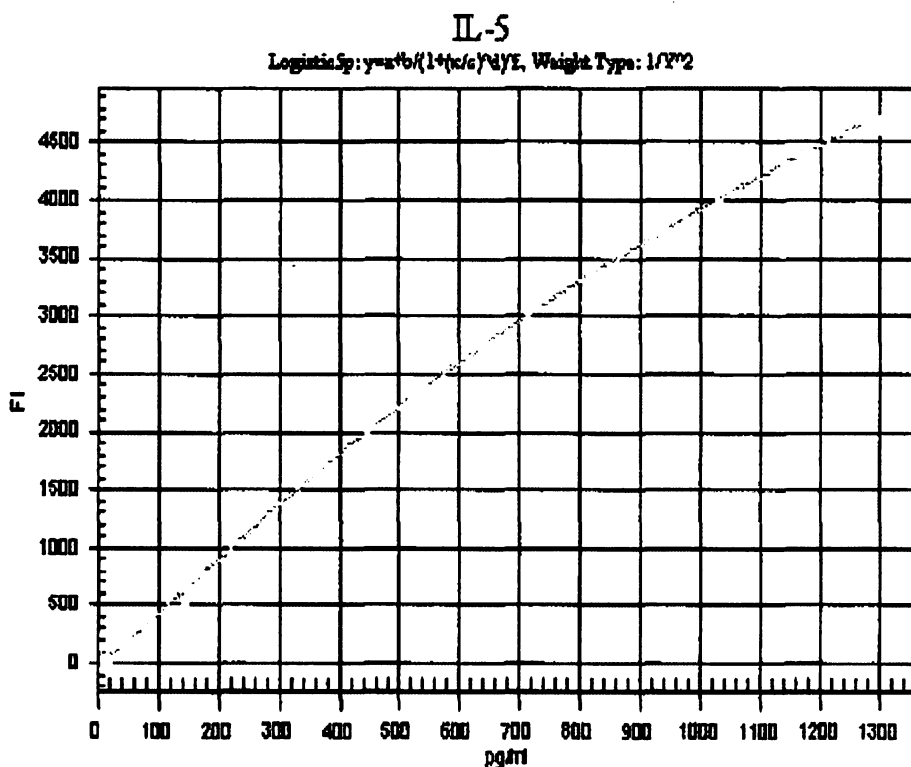
**Obr.č.10: Grafické znázornění výsledků měření v programu LUMINEX 100 IS**

Software pro IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ, TNF-α



| Bath Name: 8.8.2007, 11:08   |           |               |             |             |       |
|--|-----------|---------------|-------------|-------------|-------|
| Test Name: IL- 1alfa   |           |               |             |             |       |
| Formula: $y = 9,13E+00 + [8,15E+04 / \{(x/2,81E+02) - 1,00E+00\}]$ |           |               |             |             |       |
| Curve Data:  |           |               |             |             |       |
| Coeff1=9,134113559605885   |           |               |             |             |       |
| Coeff2=81450,4652680567  |           |               |             |             |       |
| Coeff3=28082,4422555359  |           |               |             |             |       |
| Coeff4=-1,00060384395037   |           |               |             |             |       |
| Standards:   |           |               |             |             |       |
| Loc  | Standard  | Expected Conc | MFI         | Test Result | Unit  |
| A1   | S0        | 0,00          | 9,00        | ERROR       |       |
| B1   | S7        | 3,30          | 18,50       | 3,25        | pg/ml |
| C1   | S6        | 9,90          | 44,00       | 12,08       | pg/ml |
| D1   | S5        | 29,70         | 89,00       | 27,68       | pg/ml |
| E1   | S4        | 89,00         | 233,50      | 77,85       | pg/ml |
| F1   | S3        | 267,00        | 917,00      | 317,40      | pg/ml |
| G1   | S2        | 800,00        | 2275,50     | 805,49      | pg/ml |
| H1   | S1        | 2400,00       | 6342,00     | 2371,06     | pg/ml |
| Samples:   |           |               |             |             |       |
| Loc  | Sample ID | MFI           | Test Result | CV          | Unit  |
| A2   | 5 PWM     | 481,50        | 264,32      | 22,72       | pg/ml |
| B2   | 5 HSP     | 134,00        | 43,63       | 6,03        | pg/ml |
| C2   | 5 E.Coli  | 3088,50       | 1105,58     | 152,91      | pg/ml |
| D2   | 5 A.a.    | 184,50        | 60,82       | 8,41        | pg/ml |
| E2   | 5 T.f.    | 213,00        | 70,72       | 9,78        | pg/ml |
| F2   | 5 P.g.    | 99,00         | 31,15       | 4,30        | pg/ml |
| G2   | 5 nestim. | 30,00         | 7,23        |             | pg/ml |

Obr.č.10: Grafické znázornění výsledků měření v programu LUMINEX 100 IS Software pro IL-1 $\alpha$ , IL-1b $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$



Bath Name: 3.12.2007 14:03

Test Name: IL-5

Formula:  $y=1,01E+00+[1,97E+04/[1+\{x/1,47E+03\}-6,83E-01]]^{1,94E+00}$

Curve Data:

Coeff1=1,0110669664719894

Coeff2=19719,361753129

Coeff3=1471,34372508489

Coeff4=-0,93938473903441

Coeff5=1,93938473903441

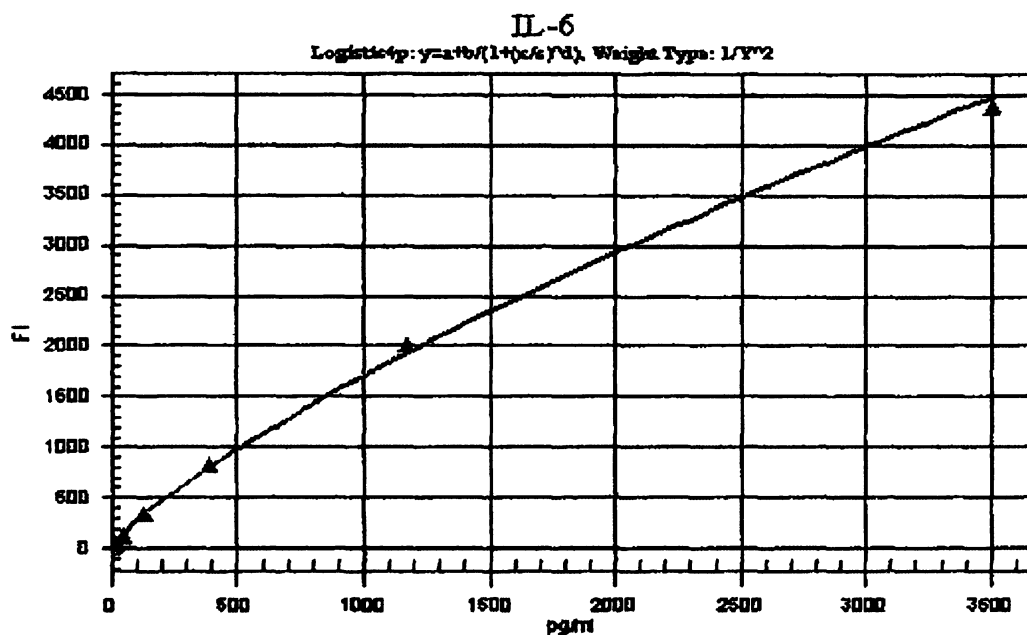
Standards:

| Loc | Standard | Expected Conc | MFI     | Test Result | Unit  |
|-----|----------|---------------|---------|-------------|-------|
| A1  | S0       | 0,00          | 1,00    | ERROR       |       |
| B1  | S7       | 1,80          | 4,00    | 1,96        | pg/ml |
| C1  | S6       | 5,40          | 11,00   | 4,96        | pg/ml |
| D1  | S5       | 16,00         | 46,00   | 15,94       | pg/ml |
| E1  | S4       | 48,00         | 236,00  | 60,87       | pg/ml |
| F1  | S3       | 144,00        | 543,00  | 125,5       | pg/ml |
| G1  | S2       | 433,00        | 2141,00 | 482,37      | pg/ml |
| H1  | S1       | 1300,00       | 4657,00 | 1271,46     | pg/ml |

Samples:

| Loc | Sample ID | MFI     | Test Result | CV | Unit  |
|-----|-----------|---------|-------------|----|-------|
| A2  | 7 PWM     | 1468,00 | 323,02      |    | pg/ml |
| B2  | 7 P+C     | 715,00  | 161,03      |    | pg/ml |
| C2  | 7 C       | 254,00  | 64,77       |    | pg/ml |
| D2  | 7 HSP     | 3,00    | 1,44        |    | pg/ml |
| E2  | 7 E.Coli  | 1,50    | 0,50        |    | pg/ml |
| F2  | 7 A.a.    | 2,00    | 0,85        |    | pg/ml |
| G2  | 7 T.f.    | 2,00    | 0,85        |    | pg/ml |
| H2  | 7 P.g.    | 2,00    | 0,85        |    | pg/ml |

**Obr.č.10: Grafické znázornění výsledků měření v programu LUMINEX 100 IS Software pro IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$**



Bath Name: 8.8.2007, 11:08  
**Test Name: IL- 6**  
 Formula:  $y = 4,03E+00 + [4,97E+04 / (1 + (x/5,91E+04)^{-8,19E-01})]$

Curve Data:  
 Coeff1=4,02663550053367  
 Coeff2=49668,3050959147  
 Coeff3=59073,7208481821  
 Coeff4=-0,818668845119543

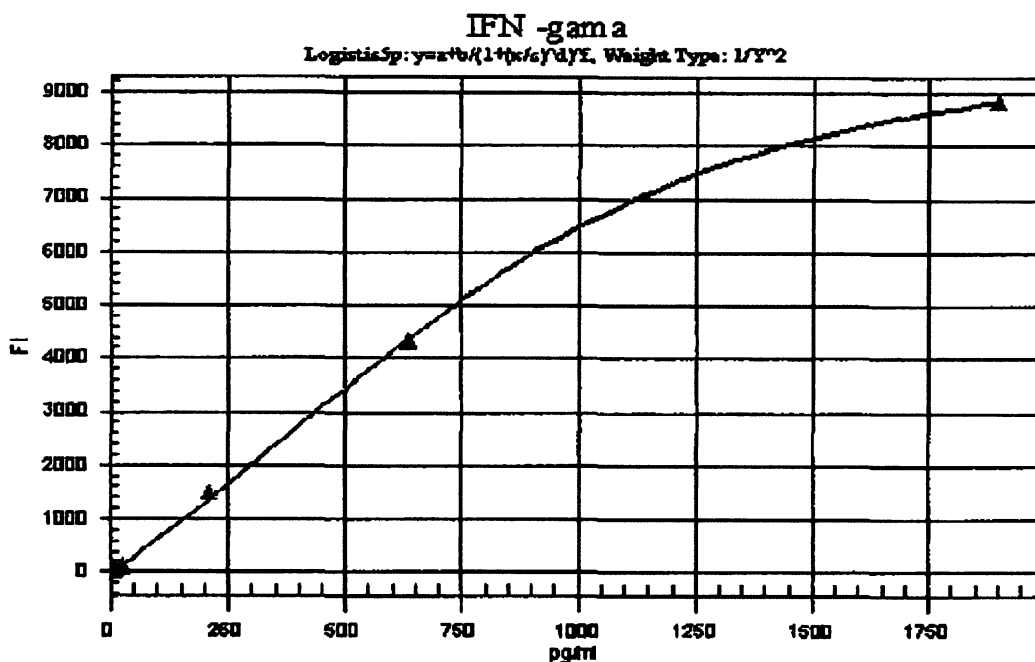
**Standards:**

| Loc | Standard | Expected Conc | MFI     | Test Result | Unit  |
|-----|----------|---------------|---------|-------------|-------|
| A1  | S0       | 0,00          | 4,00    | ERROR       |       |
| B1  | S7       | 4,80          | 28,00   | 5,26        | pg/ml |
| C1  | S6       | 14,40         | 60,00   | 14,82       | pg/ml |
| D1  | S5       | 43,00         | 123,00  | 37,39       | pg/ml |
| E1  | S4       | 130,00        | 335,50  | 131,05      | pg/ml |
| F1  | S3       | 389,00        | 834,00  | 407,12      | pg/ml |
| G1  | S2       | 1167,00       | 2013,00 | 1234,88     | pg/ml |
| H1  | S1       | 3500,00       | 4384,00 | 2405,41     | pg/ml |

**Samples:**

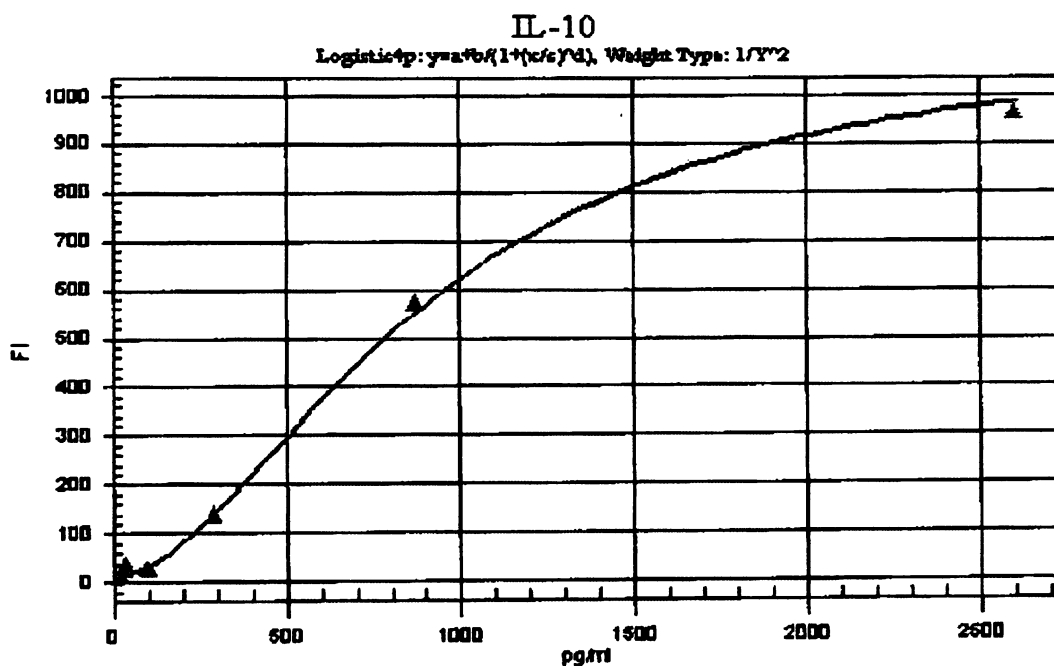
| Loc | Sample ID | MFI     | Test Result | CV     | Unit  |
|-----|-----------|---------|-------------|--------|-------|
| A2  | 5 PWM     | 4912,00 | >3500       | 198,86 | pg/ml |
| B2  | 5 HSP     | 1414,50 | 789,54      | 31,96  | pg/ml |
| C2  | 5 E.Coli  | 6786,00 | >3500       | 274,73 | pg/ml |
| D2  | 5 A.a.    | 4700,00 | >3500       | 190,28 | pg/ml |
| E2  | 5 T.f.    | 3272,50 | 2312,18     | 93,61  | pg/ml |
| F2  | 5 P.g.    | 26,50   | 4,86        | 0,19   | pg/ml |
| G2  | 5 nestim. | 89,00   | 24,70       |        | pg/ml |

Obr.č.10: Grafické znázornění výsledků měření v programu LUMINEX 100 IS  
 Software pro IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ, TNF-α



| Bath Name: 16.11.2007, 13:58   |           |               |             |             |       |  |
|--|-----------|---------------|-------------|-------------|-------|--|
| Test Name: INF- gama   |           |               |             |             |       |  |
| Formula: $y = 1,21E+01 + [9,81E+03 / \{(x/9,126E+02) - 2,83E+00\}^3,92E-01]$ |           |               |             |             |       |  |
| Curve Data:  |           |               |             |             |       |  |
| Coeff1=11,1628638298722  |           |               |             |             |       |  |
| Coeff2=9812,13107755271  |           |               |             |             |       |  |
| Coeff3=-2,82597092668259   |           |               |             |             |       |  |
| Coeff4=0,39198940061085  |           |               |             |             |       |  |
| <b>Standards:</b>  |           |               |             |             |       |  |
| Loc  | Standard  | Expected Conc | MFI         | Test Result | Unit  |  |
| A1   | S0        | 0,86          | 13,00       | 0,54        | pg/ml |  |
| B1   | S7        | 2,60          | 27,00       | 3,80        | pg/ml |  |
| C1   | S6        | 7,81          | 49,00       | 8,33        | pg/ml |  |
| D1   | S5        | 23,45         | 113,00      | 20,36       | pg/ml |  |
| E1   | S4        | 70,37         | 173,00      |             | pg/ml |  |
| F1   | S3        | 211,11        | 1489,00     | 228,45      | pg/ml |  |
| G1   | S2        | 633,30        | 4325,00     | 627,61      | pg/ml |  |
| H1   | S1        | 1900,00       | 8840,00     | 1906,02     | pg/ml |  |
| <b>Samples:</b>  |           |               |             |             |       |  |
| Loc  | Sample ID | MFI           | Test Result | CV          | Unit  |  |
| A2   | 1 PWM     | 14439,00      | >1900       | 854,37      | pg/ml |  |
| B2   | 1 P+C     | 13442,00      | >1900       | 795,38      | pg/ml |  |
| C2   | 1C        | 2948,50       | 431,64      | 25,48       | pg/ml |  |
| D2   | 1 HSP     | 444,00        | 75,19       | 4,44        | pg/ml |  |
| E2   | 1 E.Coli  | 2020,00       | 302,42      | 17,89       | pg/ml |  |
| F2   | 1 A.a.    | 7658,00       | 1311,60     | 77,60       | pg/ml |  |
| G2   | 1 T.f.    | 1183,00       | 185,05      | 10,94       | pg/ml |  |
| H2   | 1 P.g.    | 155,00        | 27,81       | 1,64        | pg/ml |  |
| A3   | 1 nestim. | 94,00         | 16,90       |             | pg/ml |  |

**Obr.č.10: Grafické znázornění výsledků měření v programu LUMINEX 100 IS  
Software pro IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ, TNF-α**



Bath Name: 13.6.2007, 12:57

Test Name: IL - 10

Formula:  $y = 1,41E+01 + [1,11E+03 / \{(x/9,03E+02)^{-1,82E+00}\}]$

Curve Data:

Coeff1=14,1211281878473

Coeff2=1111,95514237544

Coeff3=902,642294756532

Coeff4=1,82240442433555

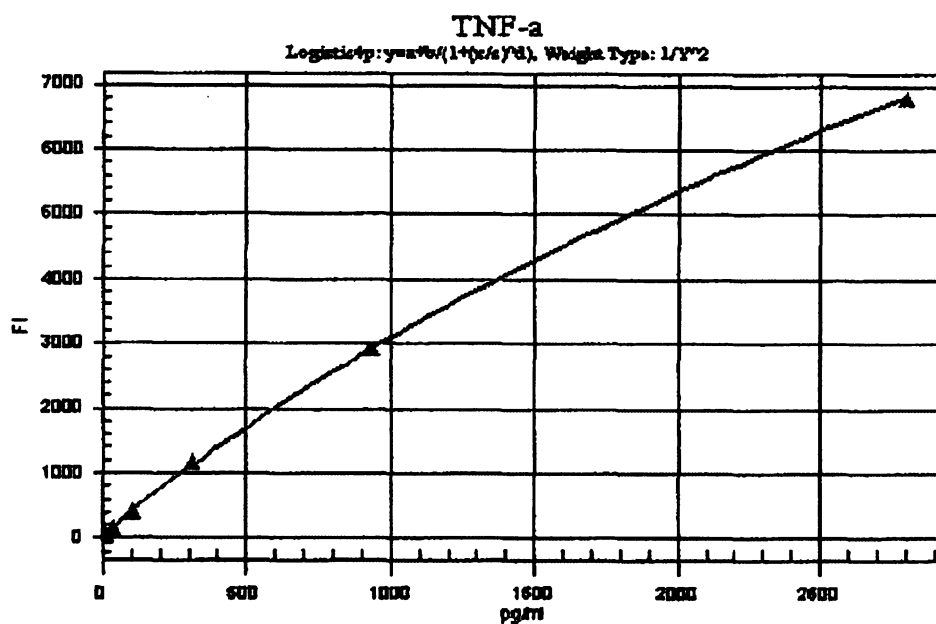
Standards:

| Loc | Standard | Expected Conc | MFI    | Test Result | Unit  |
|-----|----------|---------------|--------|-------------|-------|
| A1  | S0       | 0             | 11,00  | ERROR       |       |
| B1  | S6       | 10,7          | 21,00  | 55,6        | pg/ml |
| C1  | S5       | 32            | 35,00  | 102,97      | pg/ml |
| D1  | S4       | 96            | 29,00  | 85,25       | pg/ml |
| E1  | S3       | 289           | 141,00 | 293,17      | pg/ml |
| F1  | S2       | 867           | 573,50 | 908,75      | pg/ml |
| G1  | S1       | 2600          | 963,50 | 2377,35     | pg/ml |

Samples:

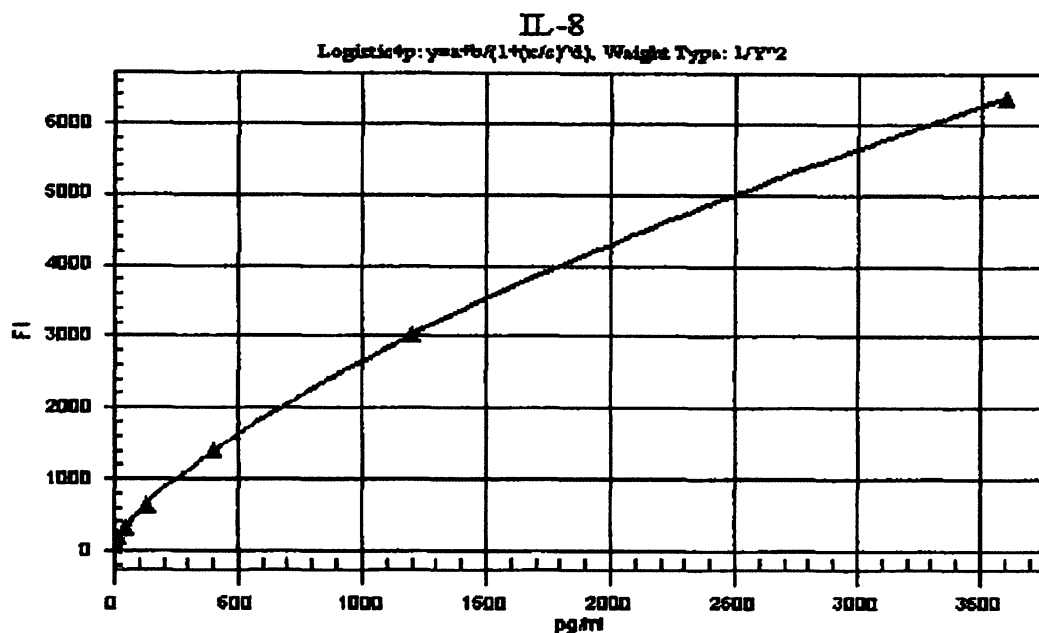
| Loc | Sample ID | MFI    | Test Result | CV     | Unit  |
|-----|-----------|--------|-------------|--------|-------|
| H1  | blank     | 8,00   | <0          |        | pg/ml |
| A2  | 2 PWM     | 609,50 | 975,81      | 139,40 | pg/ml |
| B2  | 2 P+C     | 83,00  | 203,19      | 29,02  | pg/ml |
| C2  | 2 A.a.    | 13,00  | ERROR       | 1,85   | pg/ml |
| D2  | 2 T.f.    | 10,00  | <0          | 1,42   | pg/ml |
| E2  | 2 P.g.    | 7,00   | <0          | 1,00   | pg/ml |
| F2  | 2 nestim. | 7,00   | <0          |        | pg/ml |

**Obr.č.10: Grafické znázornění výsledků měření v programu LUMINEX 100 IS  
Software pro IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$**



| Bath Name: 16.11.2007, 13:58  |           |               |             |             |       |  |
|---|-----------|---------------|-------------|-------------|-------|--|
| Test Name: TNF -alfa  |           |               |             |             |       |  |
| Formula: $y = 1,21E+01 + [9,81E+03 / \{(x/9,1,26E+02) - 2,83E+00\}] 3,92E-01$ |           |               |             |             |       |  |
| Curve Data:   |           |               |             |             |       |  |
| Coeff1=14,1628638298722   |           |               |             |             |       |  |
| Coeff2=2812,13107755271   |           |               |             |             |       |  |
| Coeff3= 842597092668259   |           |               |             |             |       |  |
| Coeff4= -0,39198940061085   |           |               |             |             |       |  |
| Standards:  |           |               |             |             |       |  |
| Loc   | Standard  | Expected Conc | MFI         | Test Result | Unit  |  |
| A1  | S0        | 0             | 13,00       | 0,54        | pg/ml |  |
| B1  | S7        | 3,8           | 27,00       | 3,80        | pg/ml |  |
| C1  | S6        | 7,81          | 49,00       | 8,33        | pg/ml |  |
| D1  | S5        | 23,45         | 113,00      | 20,36       | pg/ml |  |
| E1  | S4        | 70,37         | 173,00      |             | pg/ml |  |
| F1  | S3        | 211,11        | 1489,00     | 228,45      | pg/ml |  |
| G1  | S2        | 633,30        | 4325,00     | 627,61      | pg/ml |  |
| H1  | S1        | 2 800         | 6840,00     | 2706,02     | pg/ml |  |
| Samples:  |           |               |             |             |       |  |
| Loc   | Sample ID | MFI           | Test Result | CV          | Unit  |  |
| A2  | 1 PWM     | 11401,00      | >2800       | 854,37      | pg/ml |  |
| B2  | 1 P+C     | 580,00        | 149,63      | 795,38      | pg/ml |  |
| C2  | 1C        | 2925,50       | 937,78      | 25,48       | pg/ml |  |
| D2  | 1 HSP     | 1684,00       | 493,13      | 4,44        | pg/ml |  |
| E2  | 1 E.Coli  | 1514,00       | 436,80      | 17,89       | pg/ml |  |
| F2  | 1 A.a.    | 19,00         | 0,82        | 77,60       | pg/ml |  |
| G2  | 1 T.f.    | 1183,00       | 3,86        | 10,94       | pg/ml |  |
| H2  | 1 P.g.    | 155,00        | >2800       | 1,64        | pg/ml |  |
| A3  | 1 nestim. | 94,00         | 16,90       |             | pg/ml |  |

**Obr.č.10: Grafické znázornění výsledků měření v programu LUMINEX 100 IS  
Software pro IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$**



Bath Name: 8.8.2007, 11:08

Test Name: IL- 8

Formula:  $y = 5,67E+01 + [5,08E+04 / \{(x/4,72E+04) - 7,58E+00\}]$

Curve Data:

Coeff1=56,6982014881599

Coeff2=50805,6181078956

Coeff3=47208,6885045035

Coeff4=-0,758142411311126

Standards:

| Loc | Standard | Expected Conc | MFI     | Test Result | Unit  |
|-----|----------|---------------|---------|-------------|-------|
| A1  | S0       | 0,00          | 57,00   | 0,01        | pg/ml |
| B1  | S7       | 4,90          | 101,00  | 4,36        | pg/ml |
| C1  | S6       | 14,80         | 183,00  | 17,38       | pg/ml |
| D1  | S5       | 44,00         | 302,00  | 41,85       | pg/ml |
| E1  | S4       | 133,00        | 632,00  | 129,93      | pg/ml |
| F1  | S3       | 400,00        | 1405,00 | 407,85      | pg/ml |
| G1  | S2       | 1200,00       | 3017,00 | 1202,24     | pg/ml |
| H1  | S1       | 3600,00       | 6368,00 | 3591,32     | pg/ml |

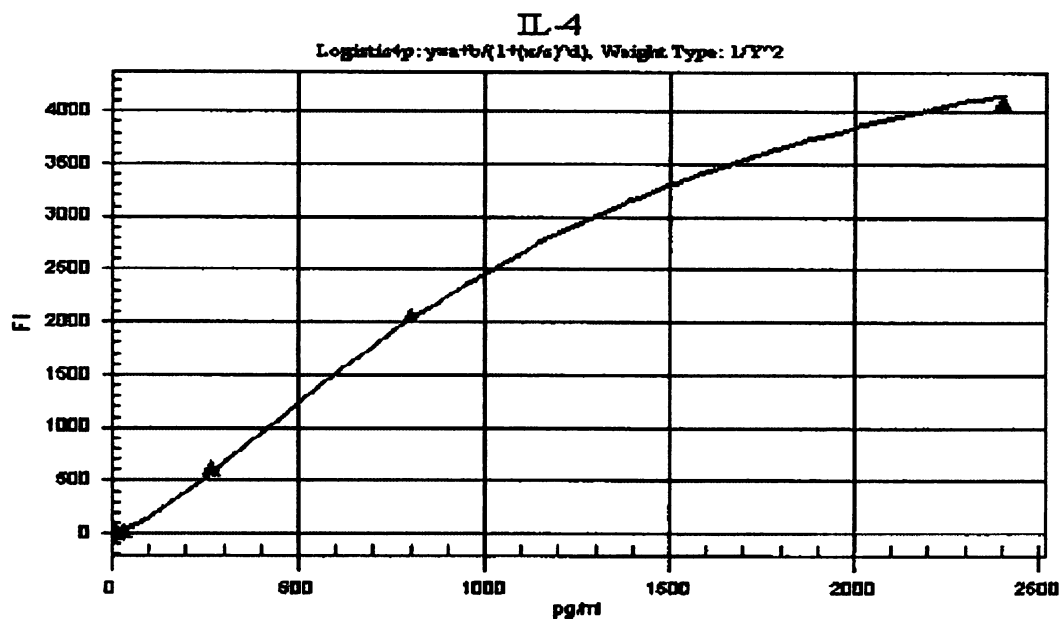
Samples:

| Loc | Sample ID | MFI      | Test Result | CV   | Unit  |
|-----|-----------|----------|-------------|------|-------|
| A2  | 5 PWM     | 9097,00  | >3600       | 1,24 | pg/ml |
| B2  | 5 HSP     | 12024,00 | >3600       | 1,64 | pg/ml |
| C2  | 5 E.Coli  | 10581,50 | >3600       | 1,44 | pg/ml |
| D2  | 5 A.a.    | 10004,00 | >3600       | 1,36 | pg/ml |
| E2  | 5 T.f.    | 8131,00  | >3600       | 1,11 | pg/ml |
| F2  | 5 P.g.    | 944,00   | 232,01      | 0,03 | pg/ml |
| G2  | 5 nestim. | 7309,00  | >3600       |      | pg/ml |



**Obr.č.10: Grafické znázornění výsledků měření v programu LUMINEX 100 IS**

Software pro IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$



Bath Name: 6.11.2007, 13:58

Test Name: IL- 4

Formula:  $y = 3,19E+00 + [5,65E+03 / \{(x/1,20E+03)^{-1,47E+00}\}]$

Curve Data:

Coeff1=3,19291956262885

Coeff2=5652,62486489223

Coeff3=1195,39320527209

Coeff4=-1,46569537493047

Standards:

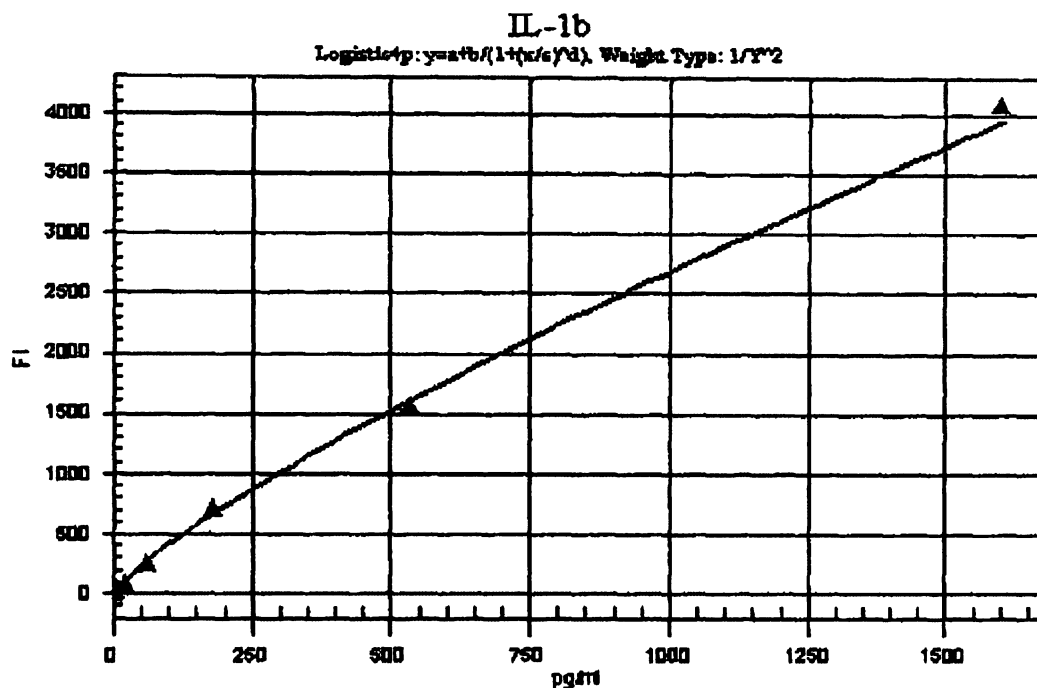
| Loc | Standard | Expected Conc | MFI     | Test Result | Unit  |
|-----|----------|---------------|---------|-------------|-------|
| A1  | S0       | 1,09          | 3,00    | ERROR       |       |
| B1  | S7       | 3,29          | 5,00    | 4,93        | pg/ml |
| C1  | S6       | 9,87          | 10,00   | 12,19       | pg/ml |
| D1  | S5       | 29,62         | 24,00   | 26,18       | pg/ml |
| E1  | S4       | 89,00         | 53,00   |             |       |
| F1  | S3       | 267,00        | 609,00  | 281,42      | pg/ml |
| G1  | S2       | 800,00        | 2059,50 | 816,35      | pg/ml |
| H1  | S1       | 2400,00       | 4093,50 | 2305,10     | pg/ml |

Samples:

| Loc | Sample ID | MFI   | Test Result | CV   | Unit  |
|-----|-----------|-------|-------------|------|-------|
| A2  | 1 PWM     | 17,00 | 19,77       | 1,62 | pg/ml |
| B2  | 1 P+C     | 14,00 | 16,72       | 1,37 | pg/ml |
| C2  | 1C        | 10,00 | 12,19       | 1,00 | pg/ml |
| D2  | 1HSP      | 10,00 | 12,19       | 1,00 | pg/ml |
| E2  | 1 E.Coli  | 8,00  | 9,61        | 0,78 | pg/ml |
| F2  | 1 A.a.    | 10,50 | 12,80       | 1,05 | pg/ml |
| G2  | 1 T.f.    | 10,00 | 12,19       | 1,00 | pg/ml |
| H2  | 1 P.g.    | 7,00  | 8,20        | 0,67 | pg/ml |
| A3  | 1 nestim. | 10,00 | 12,19       |      | pg/ml |

Obr.č.10: Grafické znázornění výsledků měření v programu LUMINEX 100 IS

Software pro IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$



Bath Name: 8.8.2007, 11:08

Test Name: IL-1beta

Formula:  $y = 3,54E+00 + [5,09E+08 / \{(x/3,02E+09)^8 - 8,15E-01\}]$

Curve Data:

Coeff1=3,53550769773004

Coeff2=509178601,155384

Coeff3=3020670179,02852

Coeff4=-0,814647390572177

Standards:

| Loc | Standard | Expected Conc | MFI     | Test Result | Unit  |
|-----|----------|---------------|---------|-------------|-------|
| A1  | S0       | 0,00          | 3,50    | ERROR       |       |
| B1  | S7       | 2,20          | 23,00   | 2,37        | pg/ml |
| C1  | S6       | 6,60          | 58,00   | 8,38        | pg/ml |
| D1  | S5       | 19,80         | 94,00   | 15,63       | pg/ml |
| E1  | S4       | 59,00         | 266,00  | 57,77       | pg/ml |
| F1  | S3       | 178,00        | 721,00  | 198,50      | pg/ml |
| G1  | S2       | 533,00        | 1567,00 | 516,45      | pg/ml |
| H1  | S1       | 1600,00       | 4092,00 | 1680,69     | pg/ml |

Samples:

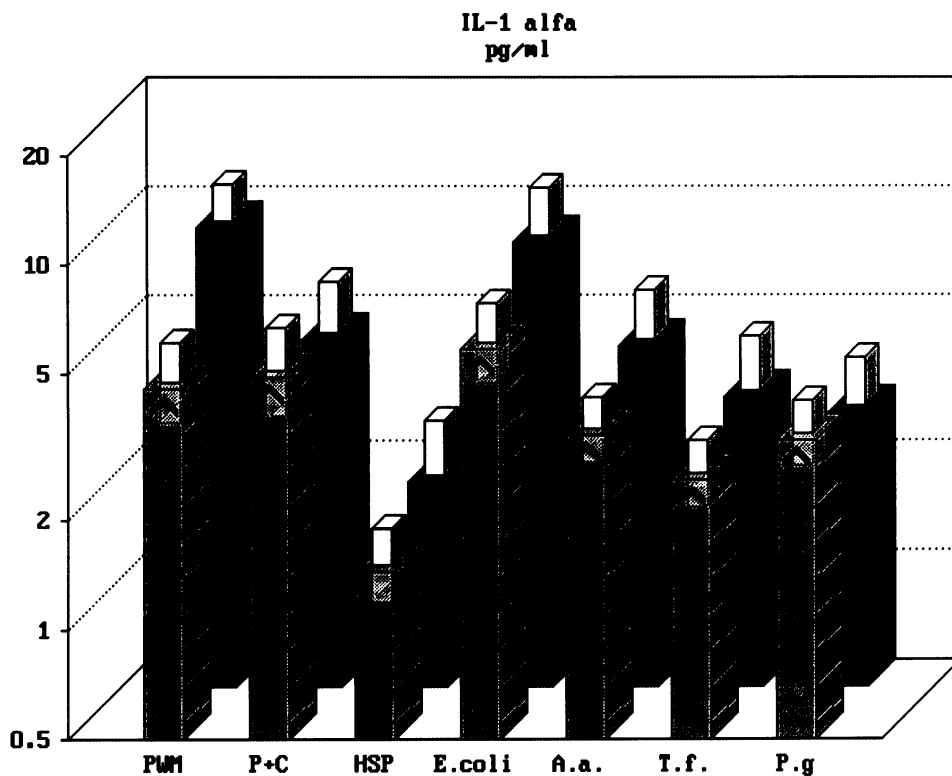
| Loc | Sample ID | MFI     | Test Result | CV     | Unit  |
|-----|-----------|---------|-------------|--------|-------|
| A2  | 5 PWM     | 87,00   | 252,73      | 27,05  | pg/ml |
| B2  | 5 HSP     | 584,00  | 153,04      | 16,38  | pg/ml |
| C2  | 5 E.Coli  | 5059,00 | >1600       | 541,64 | pg/ml |
| D2  | 5 A.a.    | 440,00  | 107,85      | 11,54  | pg/ml |
| E2  | 5 T.f.    | 272,50  | 59,53       | 6,37   | pg/ml |
| F2  | 5 P.g.    | 7,00    | 0,28        | 0,02   | pg/ml |
| G2  | 5 nestim. | 63,00   | 9,34        |        | pg/ml |

## 6.2.2 Výsledky tvorby cytokinů po mitogenní a bakteriální stimulaci 3. a 6. den

Grafy č. 1 – 9 patří grafickému znázornění výsledků po mitogení a bakteriální stimulaci mononukleárních buněk v porovnání 3. a 6. den pro námi měřené analyty.

Na základě náměřených hodnot uvádíme podíl stimulačních indexů 6. den po stimulaci vůči 3. dni po stimulaci. Signifikance byla hodnocena párovým t – testem při hladině významnosti  $P = 0,05$ .

**Graf č.1: Grafické znázornění výsledků po mitogení a bakteriální stimulaci mononukleárních buněk a 6. den pro IL – 1 alfa**



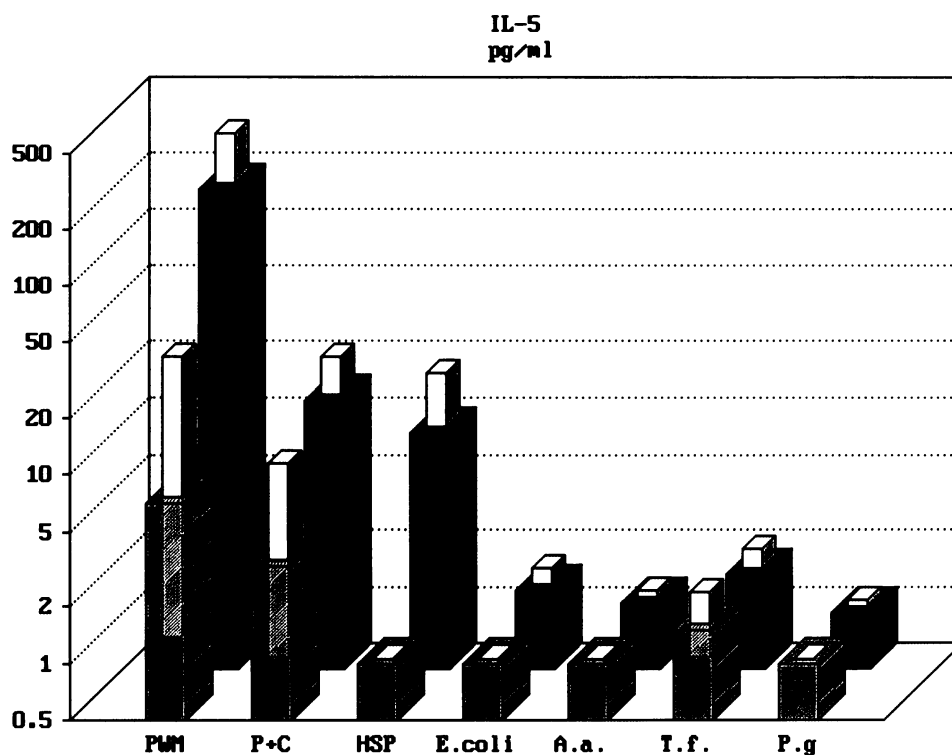
### Vysvětlivky ke grafu:

Osa x – stimulační indexy

Osa y – mitogeny a bakteriální antigeny

3. i 6. den je signifikantně zvýšená tvorba cytokinu IL – 1 alfa po stimulaci všemi stimulanty s výjimkou HSP.

**Graf č.2: Grafické znázornění výsledků po mitogení a bakteriální stimulaci mononukleárních buněk a 6. den pro IL - 5**



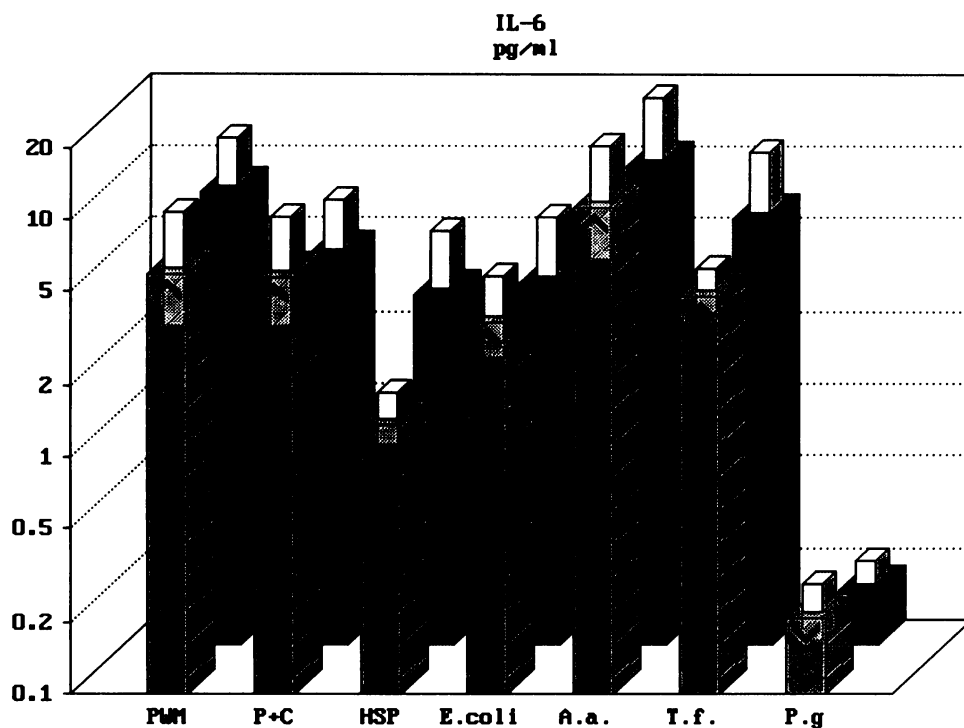
**Vysvětlivky ke grafu:**

Osa x – stimulační indexy

Osa y – mitogeny a bakteriální antigeny

6. den je signifikantně zvýšená tvorba cytokinu IL – 5 po stimulaci všemy stimulatory včetně *E.coli*.

**Graf č.3: Grafické znázornění výsledků po mitogení a bakteriální stimulaci mononukleárních buněk a 6. den pro IL - 6**



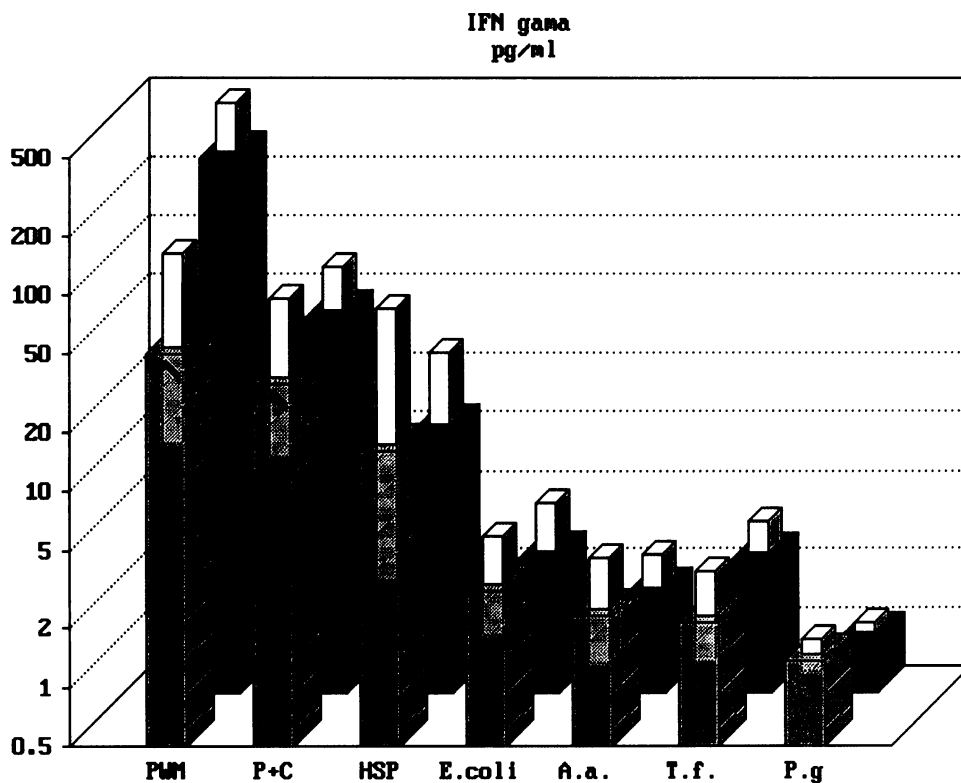
**Vysvětlivky ke grafu:**

Osa x – stimulační indexy

Osa y – mitogeny a bakteriální antigeny

3. i 6. den je signifikantní nárůst tvorby cytokinu IL – 6 po stimulaci stimulanty – PWM, P+C, HSP, *E.coli*, *A.a.*, *T.f.* včetně HSP 3 den a signifikantně nižší tvorbu jsme zjistili po stimulaci *P.g.* 3. i 6. den

**Graf č.4: Grafické znázornění výsledků po mitogení a bakteriální stimulaci mononukleárních buněk a 6. den pro IFN - gama**



**Vysvětlivky ke grafu:**

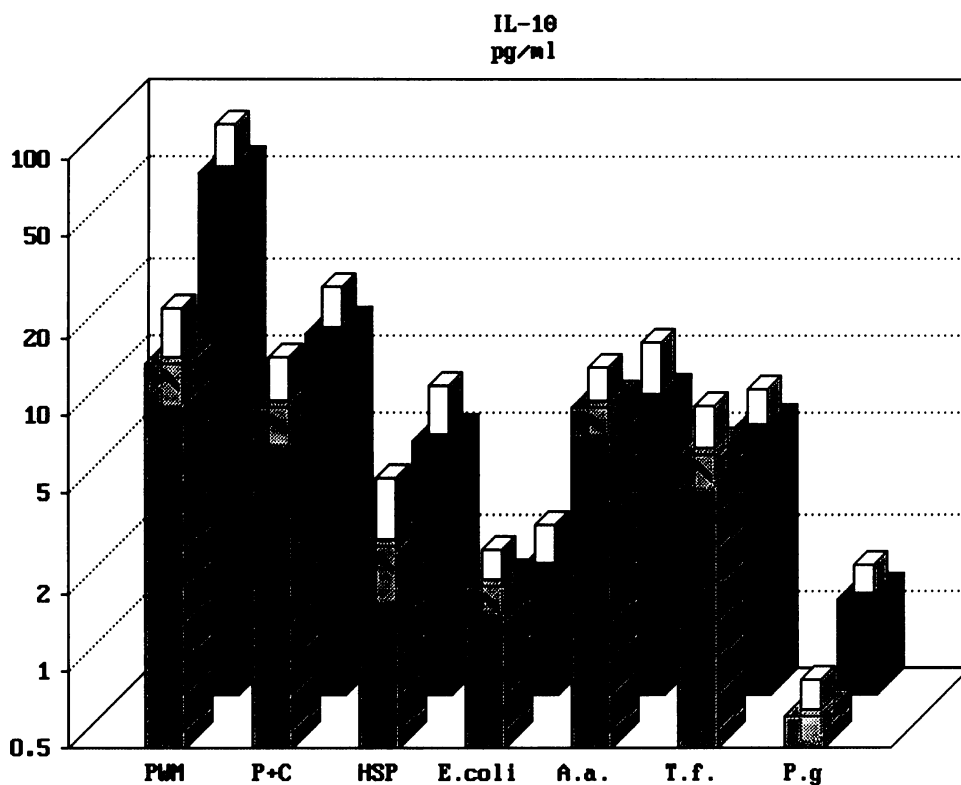
Osa x – stimulační indexy

Osa y – mitogeny a bakteriální antigeny

3. den je signifikantní nárůst tvorby po stimulaci PWM, P+C.

6. den je signifikantní nárůst po stimulaci PWM, P+C, HSP, *T.f.*

**Graf č.5: Grafické znázornění výsledků po mitogení a bakteriální stimulaci mononukleárních buněk a 6. den pro IL -10**



**Vysvětlivky ke grafu:**

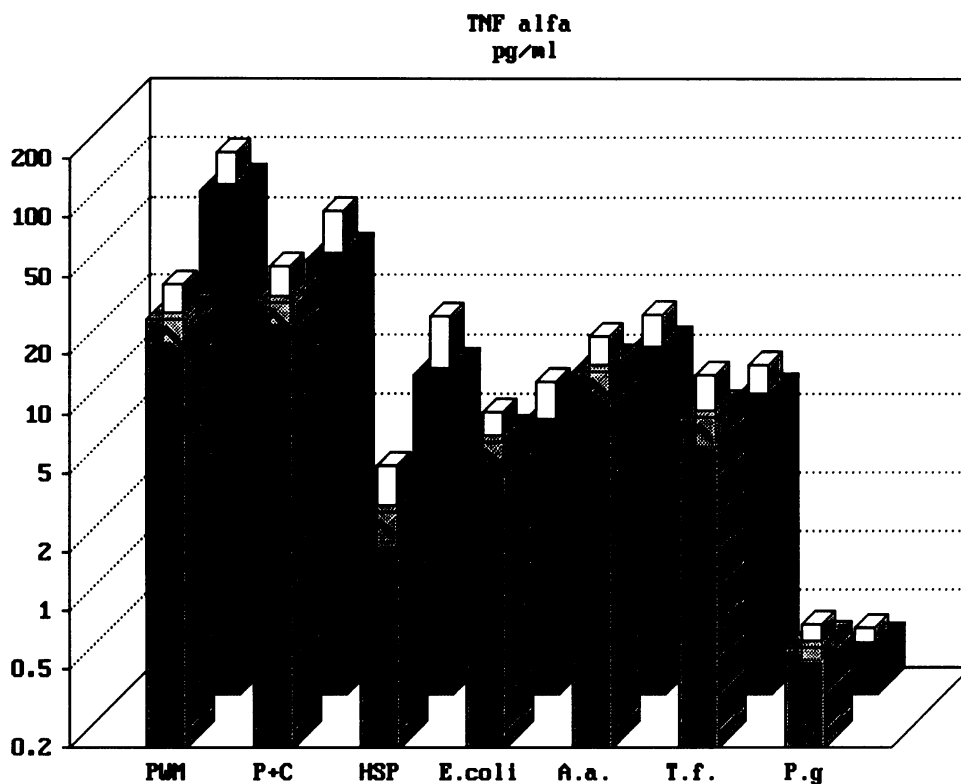
Osa x – stimulační indexy

Osa y – mitogeny a bakteriální antigeny

3. i 6. den je signifikantní nárůst cytokinů IL-10 po stimulaci PWM, P+C, HSP, A.a, T.f.

Po stimulaci *E.coli* signifikantní zvýšení tvorby cytokinu IL-10 pouze 3. den.

**Graf č.6: Grafické znázornění výsledků po mitogení a bakteriální stimulaci mononukleárních buněk a 6. den pro TNF - alfa**



**Vysvětlivky ke grafu:**

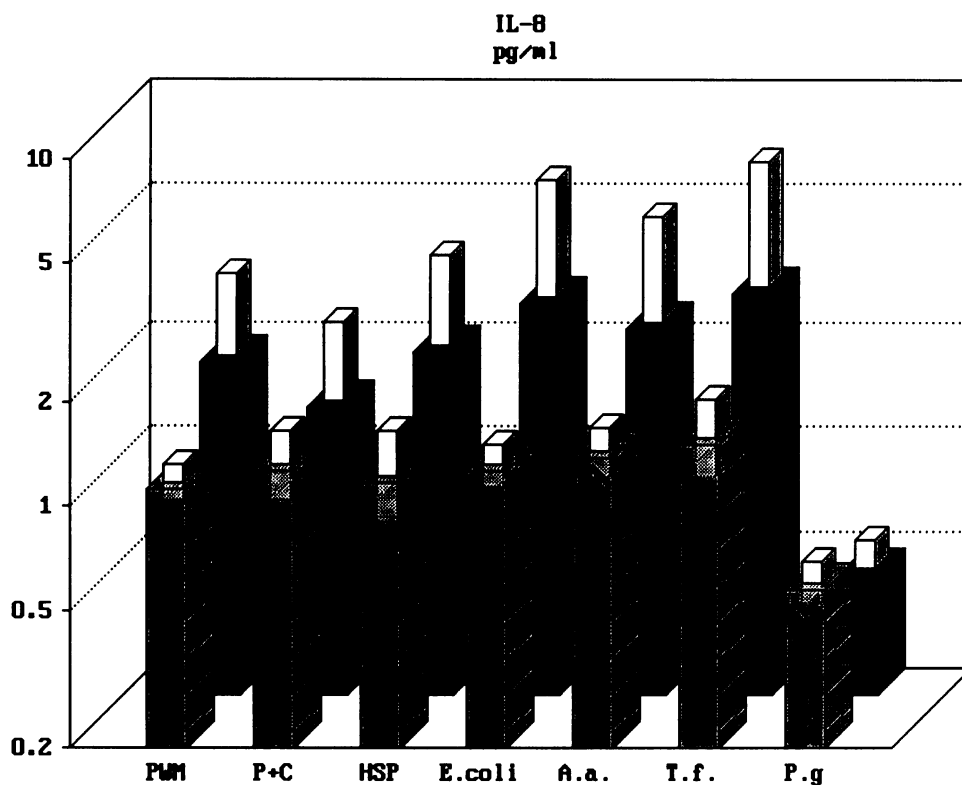
Osa x – stimulační indexy

Osa y – mitogeny a bakteriální antigeny

3. i 6. den je signifikantní zvýšení tvorby cytokinu TNF – alfa po stimulaci PWM, P+C, HSP, *E.coli*, *A.a.*, *T.f.* Výjimku tvoří signifikantní snížení tvorby TNF – alfa po stimulaci *P.g.* 3. den



**Graf č.7: Grafické znázornění výsledků po mitogení a bakteriální stimulaci mononukleárních buněk a 6. den pro IL - 8**



**Vysvětlivky ke grafu:**

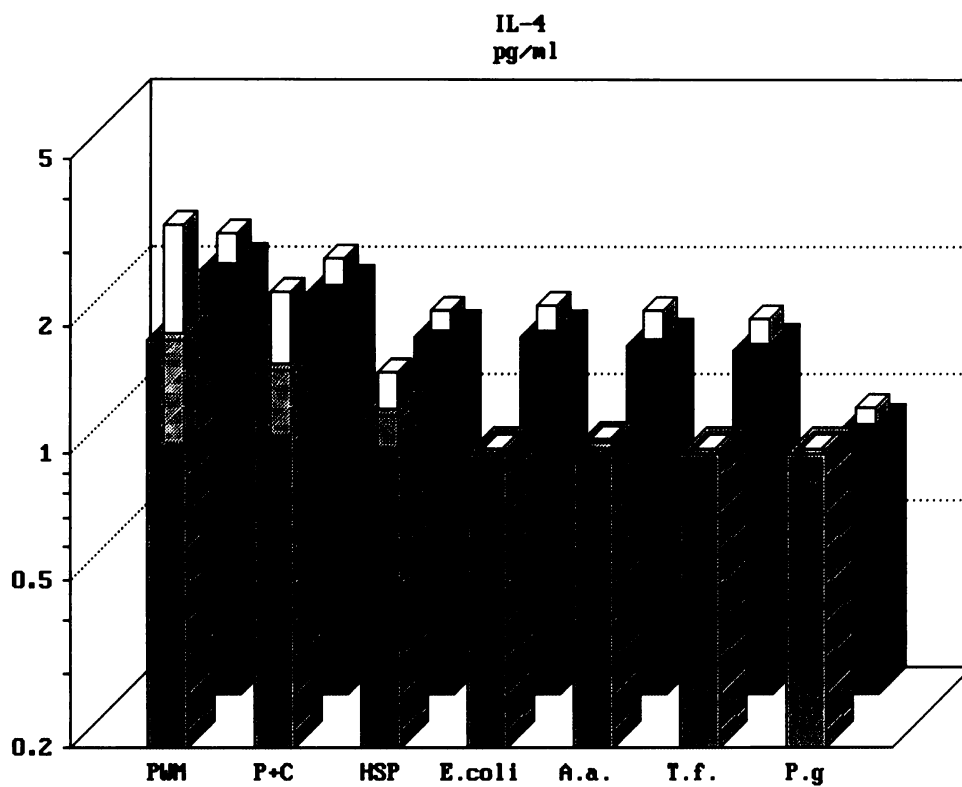
Osa x – stimulační indexy

Osa y – mitogeny a bakteriální antigeny

Nárůst tvorby cytokinu IL-8 6. den, ale velká variabilita mezi jednotlivými vzorky.

3. den signifikantní zvýšení tvorby po stimulaci *A.a.* a signifikantní snížení po stimulaci *P.g.* 3. a 6. den

**Graf č.8: Grafické znázornění výsledků po mitogení a bakteriální stimulaci mononukleárních buněk a 6. den pro IL - 4**



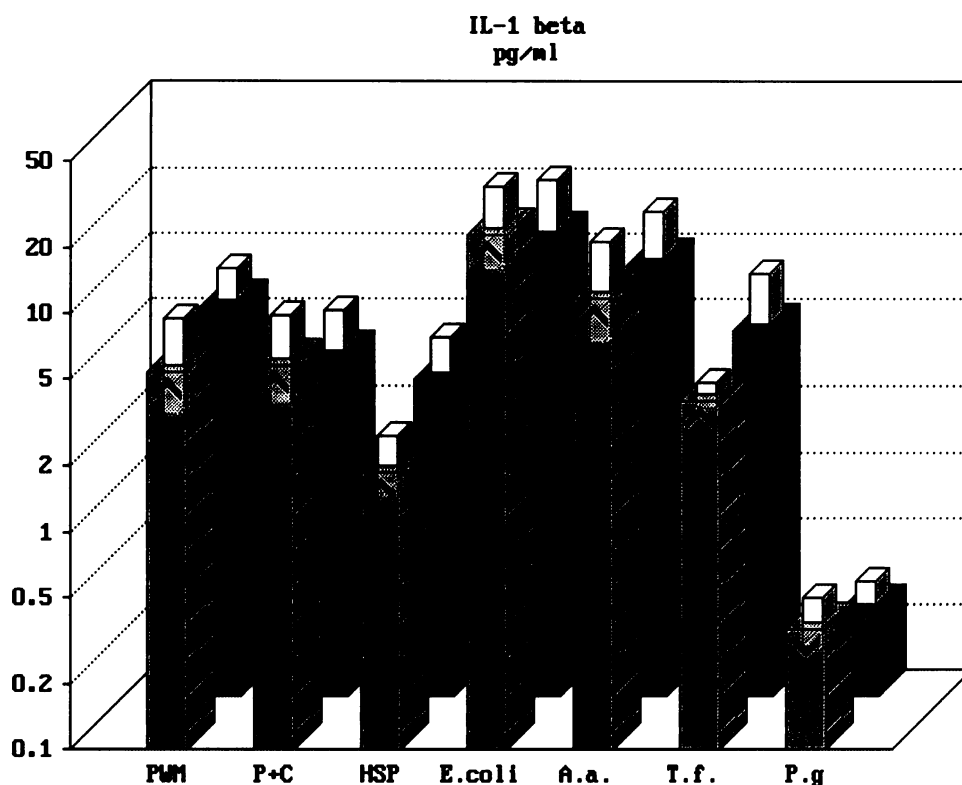
**Vysvětlivky ke grafu:**

Osa x – stimulační indexy

Osa y – mitogeny a bakteriální antigeny

Signifikantní nárůst tvorby IL – 4 6. den po stimulaci všemi mitogeny a bakteriálními antigeny s výjimkou *P.g.*

**Graf č.9: Grafické znázornění výsledků po mitogení a bakteriální stimulaci mononukleárních buněk a 6. den pro IL – 1 beta**



**Vysvětlivky ke grafu:**

Osa x – stimulační indexy

Osa y – mitogeny a bakteriální antigeny

3. i 6. den dochází k signifikantnímu nárůstu IL-1 beta po stimulaci všemi mitogeny a bakteriálními antigeny, výjimku tvoří signifikantně nižší tvorby po stimulaci *P.g.*

Shrnutí nejvýznamnějších výsledků:

U cytokinů IL – 1  $\alpha$ , IL - 1 $\beta$ , IL – 6, TNF  $\alpha$ , IL-10 jsme neprokázali signifikantní rozdíl mezi produkcí cytokinů po stimulaci mitogeny a bakteriálními antigeny 3. a 6. den. U IL-4 a IL-5 jsme prokázali signifikantně vyšší produkci 6.den oproti 3.dni. U IL – 8, IFN -  $\gamma$  jdou výsledky ovlivněny velkou variabilitou vzorků. V porovnání se stimulací mitogení a ostatních bakterií je nižší tvorba po stimulaci *P.g.* ve většině grafů.

## 6.2. VÝSLEDKY GENETICKÝCH VYŠETŘENÍ POLYMORFISMŮ GENŮ PRO CYTOKINY

Výsledky analýzy polymorfismu genů pro cytokiny byly vyhodnoceny a zpracovány v Ústavu patofyziologie MU v Brně (Tab.č.7). Pro přehlednost jsou červeně označeny dané polymorfismy v genech pro cytokiny. U těchto pacientů jsme následně korelovali produkci cytokinů s daným polymorfismem (shrnutí v kap.6.3.).

**Tab.č.7 : Výsledky analýzy polymorfismu genů pro cytokiny (převzato od prof. MUDr. Lýdie Izakovičové- Holé, Phd.)**

|     |    |    |    |    |    |      |    |    |    |
|-----|----|----|----|----|----|------|----|----|----|
| 203 | CT | AG | GG | CC | CC | 1.1. | CC | CC | GG |
| 57  | CC | AA | GG | CC | CC | 1.1. | CT | CC | GG |
| 101 | TT | GG | GG | CC | CC | 1.1. | CC | CC | AG |
| 164 | CC | AA | GG | CT | CT | 1.2. | TT | CT | AG |
| 188 | TT | GG | GG | CC | CC | 1.1. | CC | CC | GG |
| 167 | TT | GG | GG | CC | CC | 1.1. | CT | CC | GG |
| 185 | CT | AG | GG | CC | CC | 1.1. | CC | CC | GG |
| 174 | CT | AG | GG | CC | CC | 1.1. | CC | CC | AG |
| 192 | TT | GG | GG | CC | CC | 1.1. | TT | TT | AG |
| 152 | CT | AG | GG | CT | CT | 1.2. | CC | CC | GG |
| 172 | CT | AG | GG | CT | CT | 1.2. | CC | CC | GG |
| 160 | TT | GG | GG | CT | CT | 1.2. | CC | TT | GG |
| 178 | TT | GG | GG | CC | CC | 1.1. | CC | CC | GG |
| 177 | TT | GG | GG | CC | CC | 1.1. | CT | CC | AG |
| 179 | TT | GG | CG | CC | CC | 1.1. | CC | CC | GG |

### 6.3. VÝSLEDKY VZÁJEMNÉ KORELACE PRODUKCE CYTOKINŮ K POLYMORFISMU GENŮ PRO CYTOKINY

Výsledky produkce cytokinů v korelaci s polymorfismem genů pro cytokiny jsou prezentovány v následujících tabulkách (Tab.č.8 – 16)

**Tab.č.8: Výsledky vzájemné korelace vlivu polymorfismů genů pro cytokiny a stimulační mitogeny bakteriálními antigeny pro IL – alfa**

| IL - 1 alfa |     |     |               |             |             |             |   |
|-------------|-----|-----|---------------|-------------|-------------|-------------|---|
| stimulace   |     |     |               |             |             |             |   |
| PWM         | P+C | HSP | <i>E.coli</i> | <i>A.a.</i> | <i>T.f.</i> | <i>P.g.</i> |   |
| +           |     | ▲   |               |             |             |             |   |
| +           |     | ▲   |               |             |             |             |   |
| ▼           | ▲   |     |               | ▲           |             |             | ▲ |
| +           |     | -   | +             |             | +           |             | - |
| +           |     | -   | +             |             | +           |             | - |
| +           |     | -   | +             |             | +           |             | - |
|             |     | ▼   |               |             | ▼           |             |   |
|             |     |     |               |             |             |             |   |

#### Vysvětlivky symbolů:

- ▲ signifikantně vyšší stimulace u polymorfismu
- ▼ signifikantně nižší stimulace u polymorfismů
- + vyšší stimulace u polymorfismu
- nižší stimulace u polymorfismu

Hodnoceno nepárovým t-testem pro shodné rozptyly při hladině významnosti  $P=0,05$ .

Zvýšená tvorba IL-1 alfa byla u všech polymorfismů IL – 4 po stimulaci PWM, *E.coli*, *T.f.* snižena po stimulaci HSP a *P.g.*

U polymorfismu IL – 1 beta v genotypu C/T došlo k signifikantnímu snížení tvorby po stimulaci HSP a *T.f.*

U polymorfismu IL- 6 v genotypu C/T a G/A došlo ke zvýšené tvorbě IL-1 alfa po stimulaci PWM a k signifikantně zvýšené tvorbě po stimulaci HSP.

U polymorfismu IL – 6 v genotypu G/C došlo k signifikantnímu zvýšení tvorby po stimulaci P+C a naopak k signifikantnímu snížení po stimulaci PWM.

**Tab.č.9: Výsledky vzájemné korelace vlivu polymorfismů genů pro cytokiny a stimulace mitogeny bakteriálními antigeny pro IL – 5**

| IL - 5    |     |     |               |             |             |             |
|-----------|-----|-----|---------------|-------------|-------------|-------------|
| stimulace |     |     |               |             |             |             |
| PWM       | P+C | HSP | <i>E.coli</i> | <i>A.a.</i> | <i>T.f.</i> | <i>P.g.</i> |
| +         |     |     |               |             |             |             |
| +         |     |     |               |             |             |             |
| ▼         |     |     |               |             |             |             |
| +         |     | -   |               |             |             |             |
| +         |     | -   |               |             |             |             |
| +         |     | -   |               |             |             |             |
| ▲         | ▲   |     |               | ▲           |             |             |

**Vysvětlivky symbolů:**

- ▲ signifikantně vyšší stimulace u polymorfismu
- ▼ signifikantně nižší stimulace u polymorfismů
- + vyšší stimulace u polymorfismu
- nižší stimulace u polymorfismu

Hodnoceno nepárovým t-testem pro shodné rozptyly hpři hladině významnosti P=0,05.

Zvýšená tvorba IL – 5 po stimulaci PWM je u polymorfismu pro IL – 6 genotypu C/T a G/A a ve všech případech polymorfismu IL-4. U polymorfismu IL – 1 beta C/T je signifikantně zýšená tvorba IL – 5 po stimulaci PWM, P+C, *A.a.*

Naopak signifikantně nižší tvorba byla po stimulaci HSP u všech polymorfismů IL -4 a u polymorfismu IL – 6 genotypu G/C po stimulaci PWM.

**Tab.č.10: Výsledky vzájemné korelace vlivu polymorfismů genů pro cytokiny a stimulace mitogeny bakteriálními antigeny pro IL – 6**

| IL - 6    |     |     |               |             |             |             |
|-----------|-----|-----|---------------|-------------|-------------|-------------|
| stimulace |     |     |               |             |             |             |
| PWM       | P+C | HSP | <i>E.coli</i> | <i>A.a.</i> | <i>T.f.</i> | <i>P.g.</i> |
|           | -   |     |               | -           |             |             |
|           | -   |     |               | -           |             |             |
|           | ▲   |     |               | ▲           |             | ▲           |
| +         | -   | +   | +             | +           | +           |             |
| +         | -   | +   | +             | +           | +           |             |
| +         | -   | +   | +             | +           | +           |             |
| ▼         | ▼   | ▼   |               | ▼           | ▼           | ▼           |
|           |     |     |               | ▼           |             |             |

**Vysvětlivky symbolů:**

- ▲ signifikantně vyšší stimulace u polymorfismu
- ▼ signifikantně nižší stimulace u polymorfismů
- + vyšší stimulace u polymorfismu
- nižší stimulace u polymorfismu

Hodnoceno nepárovým t-testem pro shodné rozptyly hpři hladině významnosti P=0,05.

Zvýšená tvorba IL – 6 byla u všech polymorfismu pro IL – 4 po stimulaci PWM, HSP, *E.coli*, *A.a.*, *T.f.* a snižená po stimulaci P+C.

U polymorfismů pro IL – 6 v genotypu C/T a G/A ke snížení tvorby po stimulaci P+C a *A.a.* v genotypu G/C došlo k signifikantnímu zvýšení tvorby po stimulaci P+C, *A.a.*, *P.g.*

U polymorfismu IL – 1 beta C/T došlo k signifikantnímu snížení tvorby IL – 6 po stimulaci PWM, P+C, HSP, *A.a.*, *T.f.* *P.g.*

U polymorfismu TNF – alfa v genotypu A/C došlo k signifikantnímu snížení tvorby po stimulaci *A.a.*

**Tab.č.11: Výsledky vzájemné korelace vlivu polymorfismů genů pro cytokiny a stimulace mitogeny bakteriálními antigeny pro IFN – gama**

| IFN - gama |     |     |               |             |             |             |
|------------|-----|-----|---------------|-------------|-------------|-------------|
| stimulace  |     |     |               |             |             |             |
| PWM        | P+C | HSP | <i>E.coli</i> | <i>A.a.</i> | <i>T.f.</i> | <i>P.g.</i> |
| ▲          | +   | -   | +             |             | ▲           |             |
| ▲          | +   | -   | +             |             | ▲           |             |
| -          |     |     |               |             |             | ▲           |
| +          | -   | -   | ▲             | -           |             | -           |
| +          | -   | -   | ▲             | -           |             | -           |
| +          | -   | -   | ▲             | -           |             | -           |
| ▼          |     | ▼   | ▼             | ▼           |             |             |

**Vysvětlivky symbolů:**

- ▲ signifikantně vyšší stimulace u polymorfismu
- ▼ signifikantně nižší stimulace u polymorfismů
- + vyšší stimulace u polymorfismu
- nižší stimulace u polymorfismu

Hodnoceno nepárovým t-testem pro shodné rozptyly hpři hladině významnosti P=0,05.

Zvýšená tvorba IFN – gama byla u všech polymorfismů pro IL – 4 po stimulaci PWM, signifikantně zvýšená po stimulaci *E.coli* naopak snižená po stimulaci P+C, HSP, *A.a.*, *P.g.*

U polymorfismu pro IL – 6 v genotypu C/T a G/A byla signifikantně zvýšená tvorba po stimulaci PWM, *T.f.* pouze zvýšená po stimulaci P+C, *E.coli* a naopak snižená po stimulaci HSP.

U polymorfismu IL – 6 genotypu G/C byla po stimulaci PWM tvorba snižená po stimulaci *P.g.* signifikantně zvýšená.

U polymorfismu IL – 1 beta genotypu C/T došlo k signifikantnímu snížení tvorby po stimulaci PWM, HSP, *E.coli*, *A.a.*



**Tab.č. 12: Výsledky vzájemné korelace vlivu polymorfismů genů pro cytokiny a stimulace mitogeny bakteriálními antigeny pro IL – 10**

| IL - 10   |     |     |               |             |             |             |
|-----------|-----|-----|---------------|-------------|-------------|-------------|
| stimulace |     |     |               |             |             |             |
| PWM       | P+C | HSP | <i>E.coli</i> | <i>A.a.</i> | <i>T.f.</i> | <i>P.g.</i> |
| +         |     |     |               | -           |             |             |
| +         |     |     |               | -           |             |             |
| ▼         | ▲   |     |               | ▲           |             | ▼           |
| +         | +   | -   | -             | -           | -           | -           |
| +         | +   | -   | -             | -           | -           | -           |
| +         | +   | -   | -             | -           | -           | -           |
|           | ▲   | ▼   | ▼             |             | ▼           |             |

**Vysvětlivky symbolů:**

- ▲ signifikantně vyšší stimulace u polymorfismu
- ▼ signifikantně nižší stimulace u polymorfismů
- + vyšší stimulace u polymorfismu
- nižší stimulace u polymorfismu

Hodnoceno nepárovým t-testem pro shodné rozptyly hpři hladině významnosti P=0,05.

Zvýšená tvorba IL – 10 byla zjištěna u všech polymorfismů pro IL – 4 po stimulaci PWM, P+C naopak snižená po stimulaci HSP, *E.coli*, *A.a.*, *T.f.*, *P.g.*

U polymorfismu pro IL – 6 v genotypu C/T a G/A byla zjištěna zvýšená tvorba po stimulaci PWM u genotypu G/C naopak byla zjištěna signifikantně nižší tvorba IL – 10 a signifikantně zvýšená tvorba po stimulaci P+C, *A.a.* a signifikantně snižená tvorba po stimulaci *P.g.*

U polymorfismu IL -1 alfa C/T byla zjištěna signifikantně zvýšená tvorba po stimulaci P+C.

U polymorfismu IL – 1 beta C/T byla zjištěna po stimulaci HSP, *E.coli* a *T.f.* signifikantně snižená tvorba IL -10.

**Tab.č.13: Výsledky vzájemné korelace vlivu polymorfismů genů pro cytokiny a stimulace mitogeny bakteriálními antigeny pro TNF – alfa**

| TNF - alfa |     |     |               |             |             |             |
|------------|-----|-----|---------------|-------------|-------------|-------------|
| stimulace  |     |     |               |             |             |             |
| PWM        | P+C | HSP | <i>E.coli</i> | <i>A.a.</i> | <i>T.f.</i> | <i>P.g.</i> |
| ▲          | +   | +   |               |             |             |             |
| ▲          | +   | +   |               |             |             |             |
| ▼          | +   |     |               | ▲           |             |             |
| +          | +   | -   | +             | -           | +           |             |
| +          | +   | -   | +             | -           | +           |             |
| +          | +   | -   | +             | -           | +           |             |
| ▼          |     | ▲   |               |             |             |             |
| ▲          |     | ▼   |               |             |             |             |

**Vysvětlivky symbolů:**

- ▲ signifikantně vyšší stimulace u polymorfismu
- ▼ signifikantně nižší stimulace u polymorfismů
- + vyšší stimulace u polymorfismu
- nižší stimulace u polymorfismu

Hodnoceno nepárovým t-testem pro shodné rozptyly hpři hladině významnosti P=0,05.

Zvýšená tvorba TNF – alfa byla zjištěna u všech polymorfismů pro IL - 4 po stimulaci PWM, P+C, *E.coli*, *T.f.* a naopak snižená po stimulaci HSP a *A.a.*

U polymorfismů pro IL – 6 genotypu C/T a G/A byla signifikantně zvýšená tvorba po stimulaci PWM, zvýšená tvorba po stimulaci P+C a HSP.

U polymorfismu pro IL -6 genotypu G/C byla zjištěna po stimulaci P+C zvýšená tvorba po stimulaci PWM signifikantně snižená tvorba.

U polymorfismu pro IL - alfa genotypu C/T byla zjištěna po stimulaci PWM signifikantně snižená tvorba naopak po stimulaci HSP signifikantně zvýšená tvorba.

U polymorfismu pro IL -1 beta genotypu C/T byla zjištěna po stimulaci PWM signifikantně zvýšená tvorba po stimulaci HSP signifikantně snižená tvorba.

**Tab.č.14: Výsledky vzájemné korelace vlivu polymorfismů genů pro cytokiny a stimulace mitogeny bakteriálními antigeny pro IL – 8**

| IL - 8    |     |     |               |             |             |             |
|-----------|-----|-----|---------------|-------------|-------------|-------------|
| stimulace |     |     |               |             |             |             |
| PWM       | P+C | HSP | <i>E.coli</i> | <i>A.a.</i> | <i>T.f.</i> | <i>P.g.</i> |
|           |     | +   |               | +           |             |             |
| ▼         |     | +   |               | +           |             |             |
| +         | +   | +   | +             | +           | +           |             |
| +         | +   | +   | +             | +           | +           |             |
| +         | +   | +   | +             | +           | +           |             |
|           |     |     |               | ▼           |             | ▲           |

**Vysvětlivky symbolů:**

- ▲ signifikantně vyšší stimulace u polymorfismu
- ▼ signifikantně nižší stimulace u polymorfismů
- + vyšší stimulace u polymorfismu
- nižší stimulace u polymorfismu

Hodnoceno nepárovým t-testem pro shodné rozptyly při hladině významnosti  $P=0,05$ .

Zvýšená tvorba IL – 8 byla zjištěna u všech polymorfismů pro IL – 4 po stimulaci PWM, P+C, HSP, *E.coli*, *A.a.*, *T.f.*

U polymorfismu pro IL – 6 genotypu C/T a G/A byla zjištěna zvýšená tvorba po stimulaci HSP a *A.a.* u genotypu G/C pak naopak byla zjištěna signifikantně snížená tvorby IL-8.

U polymorfismu pro IL – 1 alfa C/T byla zjištěna signifikantně snížená tvorba po stimulaci *A.a.*

U polymorfismu pro IL- 1 beta C/T byla zjištěna signifikantní zvýšená tvorba IL -8 po stimulaci *P.g.*

**Tab.č.15: Výsledky vzájemné korelace vlivu polymorfismů genů pro cytokiny a stimulace mitogeny bakteriálními antigeny pro IL – 4**

| IL - 4    |     |     |               |             |             |             |
|-----------|-----|-----|---------------|-------------|-------------|-------------|
| stimulace |     |     |               |             |             |             |
| PWM       | P+C | HSP | <i>E.coli</i> | <i>A.a.</i> | <i>T.f.</i> | <i>P.g.</i> |
|           |     | ▲   |               |             |             |             |
|           |     | ▲   |               |             |             |             |
| ▼         |     |     |               | ▼           |             | ▼           |
| +         | +   | +   | +             | +           | +           | +           |
| +         | +   | +   | +             | +           | +           | +           |
| +         | +   | +   | +             | +           | +           | +           |
|           |     | ▼   | ▼             | ▼           |             |             |

**Vysvětlivky symbolů:**

- ▲ signifikantně vyšší stimulace u polymorfismu
- ▼ signifikantně nižší stimulace u polymorfismů
- + vyšší stimulace u polymorfismu
- nižší stimulace u polymorfismu

Hodnoceno nepárovým t-testem pro shodné rozptyly při hladině významnosti P=0,05.

Zvýšená tvorba IL – 4 byla u všech polymorfismů pro IL – 4 ve všech genotypech po všech stimulacích – PWM, P+C, HSP, *E.coli*, *A.a.*, *T.f.*, *P.g.*

U polymorfismů pro IL -6 genotypu C/T a G/A došlo k signifikantnímu zvýšení tvorby po stimulaci HSP u genotypy G/C došlo k signifikantnímu snížení tvorby po stimulaci PWM, *A.a.* a *P.g.*

U polymorfismu IL – 1 beta C/T došlo k signifikantnímu snížení tvorby po stimulaci HSP, *E.coli* a *A.a.*

**Tab.č.16: Výsledky vzájemné korelace vlivu polymorfismů genů pro cytokiny a stimulace mitogeny bakteriálními antigeny pro IL – 1 beta**

| IL - 1 beta<br>stimulace |     |     |               |             |             |             |
|--------------------------|-----|-----|---------------|-------------|-------------|-------------|
| PWM                      | P+C | HSP | <i>E.coli</i> | <i>A.a.</i> | <i>T.f.</i> | <i>P.g.</i> |
|                          | -   | +   | +             |             |             |             |
|                          | -   | +   | +             |             |             |             |
|                          | ▲   |     |               | ▲           |             | ▲           |
| +                        | -   | +   | +             | +           | +           |             |
| +                        | -   | +   | +             | +           | +           |             |
| +                        | -   | +   | +             | +           | +           |             |
|                          |     | ▼   | ▼             |             |             | ▼           |

**Vysvětlivky symbolů:**

▲ signifikantně vyšší stimulace u polymorfismu

▼ signifikantně nižší stimulace u polymorfismů

+ vyšší stimulace u polymorfismu

- nižší stimulace u polymorfismu

Hodnoceno nepárovým t-testem pro shodné rozptyly hpři hladině významnosti P=0,05.

Zvýšená tvorba IL – 1 beta byla u všech polymorfismů IL-4 po stimulaci PWM, HSP, *E.coli*, *A.a.*, *T.f.* a snižená po stimulaci HSP.

U polymorfismu IL – 6 genotypu C/T a G/A došlo ke zvýšení tvorby po stimulaci HSP a *E.coli*.a ke snížení po stimulaci P+C.

U polymorfismu IL – 6 genotypy G/C došlo k signifikantnímu zvýšení po stimulaci P+C, *A.a.*, *P.g.*

U polymorfismu IL – 1 beta v genotypu C/T došlo k signifikantnímu snížení tvorby po stimulaci HSP, *E.coli* a *P.g.*

**DISKUSE**

**ZÁVĚR**

## 7. DISKUSE

Parodontitida je multifaktoriální, chronické, zánětlivé onemocnění tkání tvořících závěsný zubní aparát, které v současné době postihuje až 50% dospělé populace, těžce 5 – 15% (KREJSA *et al.* 1993). Parodontitida je příkladem onemocnění, při kterém působením bakterií dochází k rozvoji akutního a později chronického zánětu, jehož následkem dochází k poškození tkáně. Výsledkem celého procesu je destrukce závěsného aparátu zubů spojená v konečné fázi z uvolňováním zubů a resorpcí alveolární kosti.

Počátky onemocnění vznikají patrně již v dospívání, a proto je třeba věnovat zvýšenou pozornost nejen rozpoznání časných stádií, ale také hodnocení změn imunitních reakcí v dlouhodobém sledování onemocnění.

Studium onemocnění parodontu prochází stále vývojem.

První úvahy můžeme nalézt již v 9. a 10. století kdy, arabští lékaři přisuzovali vznik onemocnění měkkým povlakům na zubech. U zvířat i lidí byl význam bakterií přítomných v zubním povlaku mající vliv na vznik a průběh onemocnění experimentálně potvrzen až v šedesátých letech 20. století (JORDAN A KEYES, 1964 a LOE *et al.* 1965). V této době také dochází k průkazu vztahů mezi bakteriemi zubního povlaku a humorální imunitní reakcí (MERGENHAGEN *et al.* 1965).

V 70. letech 20. století se výzkum soustředil na význam T – lymfocytů a to zejména T-lymfocytů v odpovědi na působení bakterií zubního povlaku a jejich roli v rozvoji zánětu (IVANYI a LEHNER, 1970) a na B – lymfocyty a jejich polyklonální aktivaci (PAGE a SCHRODER, 1981). KREJSA *et al.* (1993) prokázali, že v patogenezi parodontitidy se uplatňuje jak specifická, tak i nespecifická aktivace B – lymfocytů.

V průběhu 90. let minulého století dochází ke studiu T – lymfocytů a jejich rozlišení na základě cytokinového profilu. Klony  $T_H1$  jsou zdrojem cytokinů: IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-12, klony  $T_H2$ : IL-4, IL-5, IL-6, IL-13. Na základě koncepce funkčních  $T_H1$  a  $T_H2$  lymfocytů navrhli SEYMOUR *et al.* 1993 hypotézu onemocnění parodontu podle které pacienti, u nichž onemocnění progreduje, tvoří po aktivaci bakteriemi převážně klony lymfocytů  $T_H2$ , zatímco stabilní léze jsou regulovány klony  $T_H1$ . Tato hypotéza byla potvrzena i na našem pracovišti (BÁRTOVÁ *et al.* 2000, KRÁTKÁ *et al.* 2006)

Domníváme se, že odhalení  $T_H1$  a  $T_H2$  cytokinového profilu u pacientů nám přinese řadu odpovědí jak předejít onemocnění popřípadě jakou navrhnout léčbu pomocí protizánětlivé, cytokinové či genové terapie (SEYMOUR *et al.* 1996). Důkladné poznání funkcí jednotlivých cytokinů a jejich vzájemných funkčních interakcí má velký praktický význam jak pro fyziologické tak i patologické reakce organismu.

V posledních letech dochází k intenzivnímu výzkumu genetického podkladu parodontitidy. RATEITSCHAK *et al.* 1989 prokázal genetickou vnímavost u všech typů parodontitidy. Dnes se zájem studia obrací zejména na některé kandidátní geny pro cytokiny, které mají spojitost s prozánětlivou a remodelační aktivitou.

Dalším směrem výzkumu je vývoj vakcín proti parodontitidě (PERSSON *et al.* 2005) Tyto vakciny a jejich aplikace by byla vhodná zejména u pacientů s aterosklerósou a těhotných žen, které měly v minulosti předčasný porod. Vakcinace těchto osob by mohla pomoci potlačit negativní působení bakterií zubního povlaku na systémovou imunitní reakci.

Cílem našeho výzkumného projektu, ve kterém je tato práce pouze pilotní studií udávající konkrétnější směr navazujícího výzkumu, je studium polymorfismů v genech prozánětlivých a remodelačních faktorů ve vztahu k regulaci imunitní odpovědi a klinickému stavu parodontu. Předpokládáme, že polymorfismus genů pro cytokiny může být jednou z příčin rozdílné reakce tvorby cytokinů u zdravých kontrolních jedinců a pacientů. V projektu vycházíme z dosud publikovaných poznatků:

U pacientů v genu pro IL-1 byly popsány 2 jednonukleotidové polymorfismy (SNP) asociované s výskytem parodontitidy dospělých, jednalo se o alelu IL-1 $\alpha$  v pozici - 889 (záměna nukleotidů C/T) a alelu IL-1 $\beta$  v pozici + 3953 (záměna nukleotidů C/T). Kombinace těchto dvou rizikových genů tzv. kombinovaný genotyp byl zjištěn u pacientů s parodontitidou (KORNMAN *et al.* 1997, PAKHILL *et al.* 2000, LANGA *et al.* 2000). Vztah mezi parodontitidou a IL-1 kombinovaným genotypem však nebyl potvrzen v řadě publikací (HODGE *et al.* 2001, ENGBRETSON *et al.* 1999, HOLLÁ *et al.* 2004).

Dalším z cytokinů, který je schopen indukovat destrukci tkáně a kostní resorpci je TNF (tumor necrosis factor). FASSMAN *et al.* 2003 prokázali, že varianta v genu pro TNF- $\beta$  je v naší populaci asociována se snížením rizika vzniku chronické parodontitidy. HOLLÁ *et al.* 2001 však uvádí, že výskyt určitých



kombinací polymorfismů v genu pro TNF- $\beta$ , ACE a ET1 je spojen s rozvojem parodontitidy.

Velký vliv na rozvoji parodontitidy mají také bakterie zubního povlaku. Bylo prokázáno (BAINBRIDGE *et al.* 2001), že při absenci vrozené leukocytární bariéry může docházet k dramatickému přemnožení bakteriálních druhů a tím ke zvýšené hladině bakteriálních antigenů. Zvýšené množství bakterií okolo povrchu kořene zubů je doprovázeno neúspěchem hostitele účinně se bránit působení bakterií což hraje velmi významnou úlohu v etiologii onemocnění.

Náplní této práce bylo zavedení multiplexové analýzy – metody LUMINEX a její následná aplikace, měření koncentrace cytokinů po stimulaci 3. a 6. den mitogeny, bakteriemi zubního povlaku a HSP 60 a odpovědět na otázku zda se mění koncentrace tvorby cytokinů v porovnání mezi 3. a 6. dnem.

Metoda LUMINEX nám umožňuje měřit v průběhu jednoho dne nejméně 96 vzorků. Velkou výhodou je malé množství vzorku potřebného k analýze - pouze 50 $\mu$ l a snadná reprodukovatelnost výsledků, které jsou udávány v pg/ml. I když postupujeme přesně dle návodu, můžeme narazit na určitá úskalí. Z mé zkušenosti bych na první místo, při kterém si musíme dát pozor řadila - důkladné odsátí destičky dále pak šetrné zacházení s mikropartikulemi. Mikropartikule jsou velmi citlivé a snadno dochází k jejich degradaci a to nejen necitlivou manipulací v průběhu měření (např. rychlost nastavení otáček centrifugy), ale také v průběhu skladování. Je třeba, aby byly mikropartikule uchovány nejlépe v chladničce za stálé teploty. Umístěním mikropartikulí do mrazících boxů a následném rozmrazení dochází k jejich zničení. V neposlední řadě je nutné dobře nastavit přístroj LUMINEX 100 IS analyzátor a program Softwaru podle analytů, které chceme měřit.

Multiplexová analýza cytokinů se dnes používá v řadě výzkumných projektů ve zdravotnictví. Pro multiplexové stanovení cytokinů se používá skříninková metoda Ray Bitech, jejíž nevýhodou ale je velké množství použitého vzorku a nepřesné stanovení koncentrace cytokinů. Naopak metodou LUMINEX stanovíme v malém množství vzorku přesné množství cytokinů (v pg/ml). Tato metoda je vhodná nejen pro stanovení produkce cytokinů po stimulaci, ale i celé řady biologicky aktivních molekul (např. metaloproteináz, markerů aterosklerózy), které umožňují aplikaci do kliniky. Vhodnost použití metody LUMINEX jsem ověřila i v této práci.

V pilotní studii, do které bylo zahrnuto pouze 15 pacientů s chronickou parodontitidou a detekovanými jednonukleotidovými polymorfismy pro cytokiny jsme měřili tvorbu cytokinů po stimulaci mitogeny a bakteriálními antigeny

U INF- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  dochází k signifikantnímu zvýšení stimulace neředěných v případě TNF- $\alpha$  i ředěných mononukleárních buněk 6 den v porovnání s 3 dnem po stimulaci PWM. K signifikantnímu zvýšení stimulace 6 den v porovnání s 3 dnem dohází u IL-5, IL-8 po stimulaci HSP v případě IL-5 i PWM. U IL-10 dochází k signifikantnímu zvýšení stimulace 6 den v porovnání s 3 dnem u neředěných vzorků po stimulaci PWM u ředěných vzorků po stimulaci *P. gingivalis*. U IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-4, IL-6 jsme neprokázali signifikantní rozdíl mezi hladinami cytokinů 3. a 6. den po stimulaci..

Metoda LUMINEX nám umožnila stanovení výše uvedených cytokinů z jednoho vzorku. Zajímavým zjištěním, které bude dále ověřeno, byla nižší tvorba prozáněťových cytokinů (IL-5, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-8 a TNF- $\alpha$ ) po stimulaci *Porphyromonas gingivalis*, který je považován za významného patogena chronické parodontitidy. Pouze tvorba IL-4 byla po stimulaci *Porphyromonas gingivalis* zvýšena. Výsledek naznačuje význam této bakterie v aktivaci T<sub>H</sub>2 klonů lymfocytů, které ovlivňují progresi onemocnění.

V této pilotní studii jsme potvrdili, že jednonukleotidové polymorfismy v genech pro cytokiny ovlivňují jejich zvýšenou i sníženou tvorbu. Mononukleární buňky pacientů s prokázaným polymorfismem genu pro IL-1  $\beta$  tvoří po stimulaci bakteriemi *A.a.*, *E.coli*, *T.f.*, HSP signifikantně méně cytokinů IL-1  $\beta$ , ale i IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 a naopak signifikantně více IL-5 (*A.a.*) a IL-8 (*P.g.*). Všechny prokázané polymorfismy pro IL-4 naznačují vyšší tvorbu IL-4 po stimulaci všemi stimulanty, zatímco signifikantně vyšší tvorba IFN- $\gamma$  pouze po stimulaci *E.coli*.

I v této předběžné studii výsledky naznačují význam T<sub>H</sub>2 subpopulace v onemocnění parodontu a potvrzují naše předchozí výsledky (Bártová *et al.* 2000). Pro tuto studii byli pacienti náhodně vybráni.

Současně jsou tyto výsledky základem pro porovnávací studii, ve které bude stejným způsobem vyšetřena kontrolní skupina jedinců se zdravým parodontem a skupina pacientů s chronickou parodontitidou s cíleně vybranými genotypy. Výsledky jsou prioritní a zatím nebyly v tomto rozsahu sledovány v odborném zahraničním tisku.

Naše výsledky potvrzují prognózu, kterou vyslovili SEYMOUR *et al.* 1996 že „Na prahu 21. století se však musíme vrátit k základnímu poznání, že vnímavost pacienta rozhodne o tom, jaká bude konečná míra poškození parodontu a jak úspěšná bude použitá terapie.

Proti rozvoji onemocnění parodontitidy však stále zůstává nejlepší a i nejlevnější prevencí pravidelná samostatná kvalitní péče o chrup (nejméně 2krát denně) a pravidelné návštěvy u stomatologa popřípadě dentální hygienistky (nejméně 2krát za rok).

## 8. ZÁVĚR

- 1) Tato práce je pilotním projektem v celé širší výzkumného projektu, který bude i nadále pokračovat a na kterém se budu podílet v průběhu doktoranského studia.
- 2) Do naší práce jsem zavedla multiplexovou analýzu – metodu LUMINEX.
- 3) Metoda LUMINEX je vhodnou metodou pro simultání vyšetření řady biologicky aktivních molekul. Je založená na kvantitativní multiplexové analýze pomocí značených mikropartikulí. Používá se k rychlému a přesnému stanovení koncentrace velkého počtu cytokinů v malém množství tekutiny - pouze v 50  $\mu$ l vzorku (supernatant, plazma, sérum).
- 4) Výhody metody – během jednoho dne je možná analýza nejméně 96 vzorků, snadná reprodukovatelnost dat (v pg/ml).
- 5) Úskalí metody – odsátí destičky, práce s mikropartikulemi a se samotným přístrojem LUMINEX analyzárem, finanční náročnost metody.
- 7) Mononukleární buňky izolované z periferní krve pacientů s chronickou parodontitidou reagovali zvýšenou tvorbou cytokinů po stimulaci mitogeny a bakteriemi zubního povlaku v porovnání se stimulací pouze médiem. Vyjimku tvořil *P.g.* u něhož jsme našli nižší tvorbu v porovnání s ostatními aktivátory.
- 8) Potvrdili jsem, že popsané polymorfismy v genech pro cytokiny ovlivňují tvorbu cytokinů po stimulaci mitogeny a bakteriálními antigeny.
- 9) Všechny prokázané polymorfismy pro IL-4 naznačují vyšší tvorbu IL-4 po stimulaci všemi stimulatory, zatímco signifikantně vyšší tvorbu IFN-  $\gamma$  pouze po stimulaci *E.coli*.
- 10) I v této předběžné studii výsledky naznačují význam  $T_H2$  subpopulace v onemocnění parodontu a potvrzují naše předchozí výsledky.

11) Tyto výsledky jsou základem pro porovnávací studii, ve které bude stejným způsobem vyšetřena kontrolní skupina jedinců se zdravým parodontem a skupina pacientů s chronickou parodontitidou s cíleně vybranými genotypy.

## **SEZNAM LITERATURY**

## 9. SEZNAM LITERATURY

- AAP (The American Academy of Periodontology) (1989):** Consensus report on periodontal diagnosis and diagnostic aids. Proceedings of the workshop in clinical periodontics, Chicago, American Academy of Periodontology, (1), 23-31
- Albandar, J. J., Brown, L.J., Genco, R.J., Loe, H. (1997):** Clinical classification of periodontitis in adolescents and young adults, *J Periodontol*, 68, 545 – 555.
- Ali, R.W., Martin, L., Haffajee, A.D., Socransky, S.S. (1997):** Detection of identical ribotypes of *P. gingivalis* in patients residing in the United States, Sudan, Romania and Norway, *Oral Microbiol Immunol*, 12, 106-111.
- Allison, A.C. Scholemmer, H.U., Bitter-Suermann, D. (1976):** Activation of complement by the alternative pathways as a factor in the pathogenesis of periodontal disease, *Lancet*, ii, 1001-1003.
- Allison, J.P. (1994):** CD28 – B7 interactions in T cell activation. *Curr Opin Immunol* 6, 414- 419
- Altman, L.C., Page, R.C., Vandesteen, G.E. (1985):** Abnormalities of leukocyte chemotaxis in patients with various forms of periodontitis, *J Periodontol Res* 20, 553-563.
- Arbour, N.C., Lorenz, E., Schutte, B.C., Zabner, J., Kline, J.N., Schwartz, D.A. (2000):** TLR4 mutation are associated with endotoxin hyperresponsiveness in human, *Nature Genetics*, 25, 187-191.
- Armitage, G.C. (1999):** Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*, 4, 6.
- Armitage, G.C., Wu, Y., Wang, H.Y., Sorrell, J., di Giovine, F.S., Duff, G.W. (2000):** Low prevalence of a periodontitis – associated interleukin –1 composite genotype in individuals of Chinese heritage, *J Periodontol*, 71, 164-171.
- Bártová, J. (1989):** Imunitní mechanismy v patogenezi parodontitidy, Kandidátská disertační práce, MBÚ ČSAV, VÚS.
- Bártová, J., Krejsa, O., Šírová, M., Tlaskalová, H., Procházková, J., Dušková, J. (1995):** Local antibodies and cytokine response in crevicular fluid of patients with juvenile periodontitis. *Advances in Mucosal Immunology*, Part b, Plenum Press; New York, London, 1109-1112.

- Boyum, A. (1968):** Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran and ficell as erythrocyteaggregating agents, *Scand J Clin Lab Invest Suppl.*, 97, 31-50.
- Bártová, J., Opatrná, Z., Procházková, J., Krejsa, O., Dušková, J., Mrklas, L., Tlaskalová, H., Cukrowská, B. (2000):** Th1 and Th2 cytokine and early onset periodontitis and their healthz siblings. *Mediators of Inflammation*, 9: 115-120.
- Cugini, M.A., Haffajee, A.D., Smith, C., Kent, R.L.J., Socransky, S.S. (2000):** The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results, *J Clin Periodontol*, 27, 30-36.
- Cullinan, M.P., Westerman, B., Hamlet, S.M., Palmer J.E., Faddy, M.J., Lang, N.P., Seymour, G.J. (2001):** A longitudinal study of interleukin -1 gene polymorfisms and periodontal disease in general adult population, *J Clin Periodontol*, 28, 1137 – 1144.
- Dasanayake, A.P. (1998):** Poor periodontal health of the pregnant woman as risk factor for birth weight, *Ann Periodontol*, 3, 206 – 212.
- De Stefano, F., Anda, R.F., Kahn, H.S., Williamson, D.F., Russell, C.M. (1993):** Dental disease and risk of coronary hearth disease and mortality, *Br Med J*, 306, 688-691.
- Ebersole, J.L., Capelli, D., Mott, G., Kesavalu, L., Holt, S.C., Singer, R.E. (1999):** Systemic manifestations of periodontitis in the non-human primate. *J Periodontal Res*, 34(7): 358-362.
- Engbretson, S.P., Lamster, I.B., Herrera -Abreu, M., Celenti, R.S., Timms, J.M., Chaudhary, A.G., di Giovine, F.S., Korman, K.S. (1999):** The influence of interleukin gene polymorfism on expression of interleukin -1 beta and tumor necrosis factor - alpha in periodontal tissue and gingival crevicular fluid, *J. Periodontol*, 70, 567-573.
- Fletcher, J., Reddi, K., Poole, S., Nair, S.P., Henderson, B., Tabona, P., Wilson, M. (1997):** Interaction between periodontopathogenic bacteria and cytokines, *J. Periodontal Res*, 32, 200-205.
- Gorlin, R.J., Cohen, M.M., Hennekam, R.C. (2001):** Syndromes of the head and neck. Oxford, UK: Oxford University Press
- Haffajee, A.D., Socransky, S.S. (1994):** Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases, *Periodontol*, 2000, 5; 78-111.



- Haffajee, A.D., Socransky, S.S. (2001):** Relationship of cigarette smoking to the subgingival microflora, *J.Clin Periodontol*, 28, 377 – 388.
- Haraszthy, V.I., Zambon, J.J., Trevisan, M., Zeis, M., Genco, R.J. (2000):** Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol*, 71, 1560.
- Hart, T.T., Marazita, M.M., McCanna, K.K., Schenkein, H.A., Diehl, S.R. (1993):** Reevaluation of the chromosome 4q candidate region for early-onset periodontitis. *Human Genet*, 91, 416 – 422.
- Hollá, L.I., Fassmann, A., Benes, P., Halabala, T., Znojil, V., Vacha, J. (2002a):** 5 polymorphisms in the transforming growth factor –beta 1 gene (TGF – beta) in adult periodontitis, *J Clin Periodontol*, 29, 336 – 341.
- Hollá, L.I., Buckova, D., Fassmann, A., Halabala, T., Vasku, A., Vacha, J. (2002b):** Promoter polymorphism in the CD14 receptor gene and their potential associations with the severity of chronic periodontitis, *Journal of Medical Genetics*, 39, 844 – 848.
- Hollá, L.I., Fassmann, A., Stejskalová, A., Znojil, V., Vaněk, J., Vácha, J. (2004):** Analysis of the Interleukin – 6 Gene promoter polymorphisms in Czech patients Chronic Periodontitis, *J. Clin Periodontol*, 1, 30-36.
- Hořejší, V., Bartůňkova, J. (2005):** *Základy imunologie*, 3 vydání, Triton edition, Praha.
- Charon, J.A., Luger, T.A., Mergenhagen, S.E. a spol. (1982):** Increased thymocyte-activating factor in human gingival fluid during gingival inflammation. *Infect. Immun.*, 38: 1190-1195.
- Chung, H.Y., Lu, H.S., Park, H.R., Kim, S.J., Choi, J.I. (2003):** Immune response to heat shock protein in Porphyromonas gingivalis – infected periodontitis and atherosclerosis patients. *J Periodontal Res*, 38 (4): 388-393.
- Inagaki, K., Krall, E.A., Fleet, J.C., Garcia, R.I. (2003):** Vitamin D receptor alleles, periodontal disease progression and tooth loss in the VA dental longitudinal study. *J Periodontol*, 74, 161-167.
- Ivanyi, L., Lehner, T. (1970):** Stimulation of lymphocytes transformation by bacterial antigens in patients with periodontal disease. *Arch Oral Biol*; 16, 117-121.
- Ivanyi, L., Lehner, T. (1971):** Lymphocyte transformation by sonicate of dental plaque in human periodontal disease. *Arch Oral Biol.*, 15, 1117- 1121.

- Keen, L.J. (2002):** The study of polymorphism in cytokine and cytokine receptor genes, *Scientific communications*, 152 – 176.
- Kenhartaran, K.M., De Kimpe S., Robson, C., Foster, D.J., Thiemermann, C. (1998):** Mechanism of gram – positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure, *J Exp Med*, 188, 305 – 315.
- Kinane, D.F., Chestnutt, I. (2000):** Smoking and periodontal disease, *Crit Rev Oral Biol Med*, 11, 356 – 365.
- Kinane, D.F., a Hart, T.C. (2003):** Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease, *Crit Rev Oral Biol Med*, 14, 430 – 449.
- Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N., Suda, T. (2000):** Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF / RANKL - RANK interaction. *J Exp Med*, 191, 275 – 258.
- Kobayashi, T., Westerdal, N.A., Miyazaki, A., van der Pol, W.L., Suzuki, T., Yoshie, H., van der Winkel, J.G., Hara, K. (1997):** Relevance of immunoglobulin G Fc receptor polymorphism to recurrence of adult periodontitis in Japanese patients, *Infect Immun*, 65, 3556 – 3560.
- Kornman, K.S., Crane, A., Wang, H.Y., di Giovine, F.S., Newman, M.G., Pirk, F. W., Wilson, T.G. J., Higginbottom, F.L., Duff, G.W. (1997):** The interleukin – 1 genotype as a severity factor adult periodontal disease. *Periodontology 2000*, 14, 33-53.
- Krátká, Z. (1998):** Imunitní mechanismy v patogenezi parodontitidy – diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova.
- Krátká, Z. (2006):** Imunitní mechanismy v patogenezi parodontitidy – disertační práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova
- Krátká, Z., Bártová, J., Krejsa, O., Otčenášková, M., Janatová, T., Dušková, J. (2006):** Interleukin -1 gene polymorphisms and a 10 - year study of patients with early – onset periodontitis.
- Krejsa, O., Dušková, J., Bártová, J. (1993):** Studium onemocnění parodontu v mladém věku se zřetelem na objektivizaci diagnostických kriterií aktivity procesu. Závěrečná zpráva o řešení grantu IGA MZČR 0035-2
- Krejsek, J., Kopecký, O. (2004):** Klinická imunologie. Nucleus HK.

- Lalla, E., Lamster, I.B., Hofman, M.A., Bucciarell, L., Jerud, A.P., Schmidt, A.M. (2003):** Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasx Biol*, 23, 1405 – 1411.
- Lee, W., Aitken, S., Sodek, J. a spol. (1995):** Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *J Periodont Res*, 30: 23-33.
- Listgarten, M.A. (1973):** Intracellularcollagen fibrils in the periodontal ligament of the mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit. *J Periodontal Res.*; 8: 335-342.
- Loe, H., Theilade, E., Jensen, H.B. (1965):** Experimental gingivitis in man. *J Peridont Res*; 36: 177-187.
- Madianos, P.N., Bobetsis, Y.A., Kinane, D.F., (2005):** Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva.*J Clin Periodontol*, 32, 57-71.
- Mattsson, E., Verhage, L., Rollof, J., Fleer, A., Verhoef, J.,van Dijk, H.(1993):** Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate humen monocytes to release tumor necrosis factor-alpha, interleukin –1 and interleukin – 6, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 7, 281-287.
- Medzhitov, R. (2001):** Toll-like receptors and innate imminuty, *Nature Reviews Immunology*, 1, 135-145.
- Michalowitz, B.S., (1994):** Genetic and heritable risk factors in the periodontal disease. *J Periodontol*, 65, 479-488.
- Moritz, A.J., Cappelli, D., Lantz, M.S., Holt, S.C., Ebersole, J.L.(1998):** Immunization with *Porphyromonas gingivalis* cystine protease: Effects on experimental gingivitis and ligature induced periodontitis in *Macaca fascicularis*. *J Periodontol Res*; 69: 686-697.
- Niesengard, R.J., Newman, M.G., Yambon, J.J. (1994):** Niesengard RJ, Newman MG, editors. *Oral microbiologz and immunology*. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 28, Periodontal Disease: 360-384.
- Norderyd, O., Hugoson, A., Grusovin, G. (1999):** Risk of serve periodontal disease in a Swedish adult population. A longitudinal study. *J Clin Periodontol*, 26, 608 – 615.
- Offenbacher, S., Madianos, P.N., Champagne, C.M., Southerland, J.H., Paquette, D.W., Williams, R.C., Slade, G., Beck, J.D. (1999):** Periodontitis-

atherosclerosis syndrome: an expanded model of pathogenesis. *J Periodont Res* , 34(7): 346-352.

**Okada, H., Shimabukuro, Y., Kassai, Y., Ito, H., Matsuo, T., Ebisu, S., Harada, Y. (1988):** The function of gingival lymphocytes on the establishment of human periodontitis. *Adv Dent Res*; 2: 364-369.

**Otčenášková, M. (2005):** Imunitní mechanismy v patogenezy parodontitidy – diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Universita Karlova

**Page, R.C. (1991):** The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res*; 26: 230-246.

**Page, R.C. (1999):** Milestones in periodontal research and the remaking critical issues. *J Periodont Res* ; 34: 331-339

**Page, R.C., Beck, J.D., Hill, C. (1997):** Risk assessment for periodontal disease. *International Dental Journal* ; 47: 61-87.

**Page, R.C., Schroeder, H.E. (1976):** Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab. Invest.*, 235-249

**Procházková, J., Bártová, J., Bílková, A., Kružík, P., Krejsa, O., Dušková, J., Mrklas, L. (1996):** Expression of the LFA-1 $\beta$  molecule on peripheral blood leukocytes of patients with EOP: Effect of dental plaque microbes. *Folia Microbiol* ; 41(5): 441-443.

**Rateitschak, K.H., Rateitschak, E.M., Wolf, H.F., Hessel, T.M. (1989):** Periodontology. (Color atlas dental medicine 1) 2<sup>nd</sup> English Stuttgart: Thieme G.

**Renvert, S. (2003):** Destructive periodontal disease in relation to diabetes melitus, cardiovascular disease, osteoporosis and respiratory disease. *Oral Health Prev Dentist*

**Seymour, G.J., Gemmel, E., Reinhardt, R.A., Eastcot, J., Taubman, M.A. (1993):** Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: Cellular and Molecular mechanism. *J Periodont Res* ; 28: 478-486.

**Seymour, G.J., Westerman, B., Cullinam, M. (1996):** Periodontics into the 21<sup>st</sup> century. *Adv Exp Med Biol* , 406: 359- 63.

**Shibutami, T., Gen, K., Shibata, M., Horiguchi, Y., Kondo, N., Iwayama, Y. (2000):** Long-term follow –up of periodontitis in a patient with Chediak – Higashi syndrome. A case report. *J Periodontol*, 71, 1024-1028.

- Sjödin, B., Matsonn, L., Unell, L., Ebelberg, J. (1993):** Marginal bone loss in the primary dentition of patients with juvenile periodontitis, *J Clin Periodontol*, 20, 32 – 36.
- Socransky, S.S., Gibbons, R.J., Dale, A.C., Bortnick, L., Rosenthal, E. MacDonald, J.B. (1963):** The microbiota of the gingival crevice area of man I. Total microscopic and variable counts and counts of specific organism. *Arch Oral Biol*; 8: 275-280
- Stamm, J.W. (1986):** Epidemiology of gingivitis, *J Periodontol*, 13, 360 – 370.
- Sundqvist, G.K., Carksson, J., Herrmann, B.F., Tarnvik, A. (1985):** Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black – pigmented *Bacteroides*, *Journal of Medical Microbiology*, 19, 85-94.
- Takahashi, K., Nagai, A., Satoh, N., Kurihara, H., Murayma, Y. (1995):** Studies on phenotypic and functional characterization of peripheral blood lymphocytes from patients with EOP. *J Perriodontol Res* ; 66: 391-396
- Temple, T. R., Kimball, H.R., Kakehashi, S., Amen, C.R. (1972):** Host factor in periodontal disease: periodontal manifestations of Chediak – Higashi syndrome. *Periodontal Res*, 7, 26 – 27.
- Tonetti, M.S. (1997):** Molecular factors associated with compartmentalization of gingival immune responses and transepithelial neutrophil migration. *J Peridont Res* ; 32: 104-109
- Ueki, K., Tabada, K., Yoshie, H., Yamazaki, K. (2002):** Self heat-shock protein 60 induces tumor necrosis factor – alpha in monocyte-derived macrophage: possible role in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Exp Immunol*, 127, 72-77.
- Van Dyke, T.E., Champagne, C.M.E. (1995):** Neutrophils and oral disease. *Dtsch Zahnartzl Z* ; 50: 278-286.
- Wang, Z.M., Liu, C., Dziarski, R., (2000):** Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by *Staphylococcus aureus*, peptidoglycan and endotoxin, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 20260 – 20267.
- Wick, G. (2000):** Aterosklerosis – an autoimmune disease due to an immune reaction against heat shock protein 60. *Herz* , 25: 87-90
- Watnabe, K (1990):** Prepubertal periodontitis: a review of diagnostic criteria, pathogenesis and diferential diagnosis, *J Periodont Res*, 25, 31-48.

**Wu, T., Trevisan, M., Genco, R.J., Falkner, K.L., Dorn, J.P., Sempos, C.T. (1998):** Possible biological pathways linking periodontal infection to cardiovascular disease: The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol*, 147:66.

**Zambon, J.J.,Tempo, P.J. (1995):** Imunne responses to periodontal pathogens. *Dtsch Zahnartzl Z* , 5: 357-360.

# **PŘÍLOHY**





